

**Untersuchungen über die optimalen  
Bedingungen bei der Herstellung  
von Amnionprimärkulturen**

Frankfurt/M.

Ingeborg Debes

1965



Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität  
Frankfurt am Main

Direktor: Prof. Dr. K. Herzberg

Untersuchungen über die optimalen Bedingungen  
bei der Herstellung von Amnionprimärkulturen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der gesamten Medizin  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Ingeborg Debes  
aus Korbach

Frankfurt/M. 1965

Dekan :                    Professor Dr. med. H. Frick  
Referent :                Priv. Doz. Dr. med. G. May  
Korreferent :            Professor Dr. med. W. Rotter  
Mündliche Prüfung :    20. August 1965



# Übersicht

|                                                                                                                                  | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Einleitung                                                                                                                       | 1     |
| Material und Methode                                                                                                             |       |
| 1. Lösungen und Kulturgefäße                                                                                                     | 4     |
| 2. Verarbeitung der Gewebe                                                                                                       | 5     |
| 3. Methoden der Auswertung                                                                                                       | 7     |
| Ergebnisse                                                                                                                       |       |
| I. Allgemeine Bedingungen der Zellisolierung mit Trypsin<br>Difco 1:250 0,2% in PBS als Standardfermentlösung                    |       |
| A. Unterschiede, die durch das verarbeitete Gewebe be-<br>dingt sind                                                             |       |
| 1. Unterschiede zwischen den einzelnen Amnionhäuten                                                                              | 9     |
| 2. Unterschiede der Zellausbeute und -güte auf<br>verschiedenen Stellen des selben Amnions                                       | 11    |
| 3. Einfluß von Art und Dauer der Aufbewahrung des<br>Materials vor der Verarbeitung auf Ausbeute und<br>Brauchbarkeit der Zellen | 13    |
| B. Variation der Ergebnisse durch die Art der Ferment-<br>einwirkung                                                             |       |
| 1. Der pH-Wert des Fermentes                                                                                                     | 17    |
| 2. Die Trypsinierungszeit                                                                                                        | 20    |
| 3. Die Konzentration des Fermentes                                                                                               | 24    |
| 4. Die Trypsinierung bei verschiedenen Temperaturen                                                                              | 26    |
| II. Verschiedene Reinheitsgrade des Trypsins. Verschiedene<br>Zubereitungen. Andere Fermente und Komplexbildner                  |       |
| 1. Verschiedene Reinheitsgrade des Trypsins                                                                                      | 29    |
| 2. Verschiedene Zubereitungen. Glycerinzusatz.<br>Calcium- und phosphatfreie Pufferlösungen.                                     | 32    |
| 3. Papain                                                                                                                        | 41    |
| Diskussion                                                                                                                       | 44    |
| Zusammenfassung                                                                                                                  | 52    |
| Literaturverzeichnis                                                                                                             | 54    |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Auf der Suche nach geeignetem menschlichen Gewebe zur Vermehrung von Poliomyelitisvirus verwendeten erstmals Milzer, Levinson, Vanderboom und Adelman 1950 menschliches Amnion und Chorion in der Gewebekultur. Die Autoren gingen von mechanisch zerkleinerten Gewebsstückchen aus. Das Wachstum war dementsprechend unregelmäßig, und positive Ergebnisse fanden sich nur in zwei von dreizehn Fällen. Aber es war bewiesen, daß die Virusvermehrung auf Amnion möglich ist.

1955 erhielten dann Zitcer, Fogh und Dunnebacke nach der Aussaat trypsinisolierter Amnionepithelzellen einen gleichmäßigen Zellrasen und hatten damit ein brauchbares, leicht zu beschaffendes und empfindliches Gewebe zur Züchtung und Diagnostik menschen-pathogener Virusarten, das an vielen Stellen die Affennierenzelle gleichwertig ersetzen konnte. Die Methode fand rasch Verbreitung, wurde weiter ausgebaut und modifiziert (Dunnebacke 1956, Lahelle 1956, Weinstein, Alexander, Yoshihara und Kirby 1956, Takemoto und Lerner 1957, Dunnebacke und Zitcer 1957, Mandin und Pourquier 1957, Lennartz und Kersting 1958, Lehmann-Grube 1961). Dauerzellstämme wurden 1957 von Fogh und Lund ( FL ) sowie von Zitcer und Dunnebacke (1957) isoliert.

Das Amnion liefert eine hohe Ausbeute homogener Epithelzellen, praktisch ohne fibrozytäre Beimengungen, und zeigt in der Gewebekultur einen morphologisch einheitlichen, übersichtlichen und meist rasch geschlossenen Zellrasen. Als embryonales Gewebe besitzt es eine starke Wachstums- und Vermehrungstendenz. Es erweist sich in der Primär- und Subkultur empfindlich für ein breites Spektrum menschenpathogener Virusarten.

In letzter Zeit gewinnt die Amnionzellkultur eine besondere Bedeutung bei der Prüfung des Poliomyelitis-Schluckimpfstoffes auf menschenpathogenes Virus. (Staatsanzeiger für das Land Hessen, 14 § 10, 1962).

Dabei sind größere Ansätze erforderlich, und es ist daher wichtig, nach einer möglichst zuverlässigen, ergiebigen und schonenden Methode bei der Herstellung der Primärkultur zu verfahren.

Die heutigen Methoden der Gewebekultur beruhen auf einer fermentativ-proteolytischen Zellisolierung, wobei die Einzelzellen durch Abbau der Interzellulärsubstanz aus dem Verband herausgelöst werden. Dieses Verfahren wurde zum ersten Male 1916 von Rous und Jones in der Subkultur angewendet, dann aber erst 1952 durch Dulbecco und durch Moscona und Moscona wieder aufgenommen und zur Aufschließung von Gewebe für die Primärkultur eingeführt. Seitdem ist es in der Gewebekultur weiterentwickelt und allgemein gebräuchlich geworden.

Neben dem bei der Zellisolierung zumeist verwendeten Trypsin fanden noch eine Reihe anderer Fermente und organischer Verbindungen Eingang in die Gewebekultur:

Elastase, ein weiteres Ferment aus Pankreas, das spezifisch die elastischen Fasern abbaut (Balò und Banga 1949 und 1950, Bagdy und Banga 1957), zeigte auch bei der Zellgewinnung sehr gute Ergebnisse (Rinaldini 1958, Füzi, Toth und Borsy 1960). Das rohe Pancreatin mit dem Gesamtgehalt der Pankreasfermente wurde ebenfalls brauchbar gefunden (Rinaldini 1958).

Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* Welchii war zur Isolierung von Mamma- und Lungenepithelzellen besser geeignet als Trypsin (Lasfargues 1957, Hinz und Syverton 1959).

Hyaluronidase aus Testis wurde benutzt, um die mit Trypsin gewonnenen Zellen am Wiederverkleben und der Bildung großer Gerinnsel zu hindern (St. Amand und Tipton 1954, Katsuta, Takaoka und Saito 1957). Das aus dem Saft von *Carica papaya* hergestellte Papain eignete sich in manchen Fällen zur Zellisolierung (Northrop 1947, Westwood, Macpherson und Titmuss 1957, Rinaldini 1958, Hoang, Rohde und Kotschate 1959), ebenso wie das aus dem Saft der Feige gewonnene Ficin (Northrop 1947, Westwood, Macpherson und Titmuss 1957). Allein oder zur Unterstützung dieser Fermente wurden die Calciumkomplexbildner Versen und Citrat benutzt (Zwilling 1954, Westwood und Titmuss 1957, Fogh und Lund 1957; Anderson 1953, Rinaldini 1958).

Ohne Ferment in stark alkalischem Milieu isolierte Mookerjee 1953 Zellen aus Hühnerembryo, deren Wachstum in der Gewebekultur aber nicht untersucht wurde.

Die vorliegende Arbeit soll versuchen, die optimalen Bedingungen für die Gewinnung der Zellen festzustellen.

## Material und Methoden

## 1. Lösungen und Kulturgefäße

## a. Pufferlösungen

Zum Aufbewahren und Waschen der Placenta und des Amnions diente die 1954 von Dulbecco und Vogt angegebene Phosphatpufferlösung (PBS): NaCl 8g, KCl 0,2g,  $MgCl_2$  0,1g,  $NaH_2PO_4 + 12 H_2O$  2,89g,  $K_2HPO_4$  0,2g,  $CaCl_2$  0,1g auf 1000 ml  $H_2O$ .

In PBS wurden auch in allen Fällen, in denen nichts anderes vermerkt ist, die Fermente gelöst. Zu einigen Versuchen, besonders zur Lösung von Versen, wurde PBS ohne Calcium- und Magnesiumsalze angesetzt. Schließlich wurde Trypsin auch in der 1957 von Puck, Cieciura und Fisher beschriebenen phosphatfreien Lösung benutzt: Phenolrot 0,02g, NaCl 8g, KCl 0,4g, Glucose 1g,  $NaHCO_3$  0,35g auf 1000 ml  $H_2O$ .

## b. Nährmedium

Als Nährmedium wurde ausschließlich die von May 1959 angegebene Lösung verwendet, wobei die Serumkonzentration auf 10% herabgesetzt und ein Vitaminkomplex dazu gegeben wurde: Hanks-Lösung 90%, Kälberserum 10%, Caseinhydrolysat 0,5% + Vitamine. Der pH-Wert wurde mit  $NaHCO_3$  auf 7,2-7,4 eingestellt.

## c. Sterilisation

Puffer-, Nähr- und Fermentlösungen wurden durch Seitzfilter mit 2 Liter Aufgußraum und Filterschicht EKSII gegeben. Die ersten 100-200 ml des Filtrates wurden verworfen, um die aus der Filterschicht sich lösenden Salze nicht in die Lösungen zu bekommen. Versen-, Citrat-, Kollidon- und calciumfreie Phosphatpufferlösung wurden 30 Min. bei  $120^\circ C$  autoklaviert.

## d. Antibiotika

Zum Aufbewahren und Waschen der Eihäute erhielt die Pufferlösung einen Zusatz von 200 E/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 100 E/ml Moronal. Der Nährlösung

wurde die gleiche Menge Penicillin und Streptomycin zugesetzt, aber Moronal nur in den Fällen, in denen bereits geschlossene Kulturen längere Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden sollten.

#### e. Kulturgefäße

Zur Aussaat der Zellen dienten Rouxschalen mit 80 ml, Fernbachkolben mit 120 ml, Vierkantflaschen mit 15 ml und 100ml-Erlenmeyerkolben mit 8 ml Zellsuspension beschickt.

### 2. Verarbeitung der Gewebe

#### a. Trypsinierung des Amnions

Die Trypsinierung des Amnions erfolgte nach der von May und Shu (1964) ausgearbeiteten Methode, die einfacher, schonender und ergiebiger ist als die bislang in der Literatur beschriebenen Verfahren.

Die Placenta wird steril abgenommen und in einer Schale mit PBS bedeckt bis zur Verarbeitung aufgehoben.

Das Amnion wird mit Gummihandschuhen vom Chorion abgelöst, in einer Schale in PBS mit 2 Pinzetten sorgfältig von Blutgerinnseln und der gallertig-schleimigen Zwischenschicht zwischen Amnion und Chorion befreit, 2-3 mal in Pufferlösung gewaschen und in 2-3 Stücke geschnitten. In einem 1000 ml-Erlenmeyerkolben übergießt man es mit 100 ml angewärmter Trypsinlösung und inkubiert bei 37° C für 15 Min. Darauf wird der Kolben leicht geschüttelt, das Ferment abgegossen und verworfen und durch 250 ml neues warmes Trypsin ersetzt. Hiermit stellt man das Amnion erneut in den Brutschrank und bewegt alle 30 Min. einmal langsam und vorsichtig, um die Haut ganz auszubreiten. Nach Ablauf der Trypsinierungszeit nimmt man das Amnion mit einer Pinzette aus der Fermentlösung, läßt es etwas abtropfen und bringt es in einen neuen 1000ml-Erlenmeyerkolben mit angewärmter Nährlösung.

Hierin wird die Haut zunächst langsam und schonend, dann zunehmend kräftiger geschüttelt. Die Zellsuspension wird abgegossen und durch neue Nährlösung ersetzt. Man wird etwa 400-500 ml Nährmedium in 3-4 Portionen verwenden, von denen die erste die größte sein soll, da durch ihren Serumgehalt das Trypsin inaktiviert werden muß. Mehr als viermaliges Ausschütteln bringt kaum noch verwendbare Zellen. Die Zellen lösen sich umso leichter, je größer die Reibung ist. Darum sind ein möglichst großer Kolben mit flachem Boden und ein in mehrere Teile geschnittenes Amnion am günstigsten. Die gewonnene Zellsuspension wird anschließend mit Nährmedium weiter auf die gewünschte Zellzahl, meist 350 000/ml, verdünnt und mit Antibiotika versehen ausgesät.

b. Trypsinierung von Hühnerembryonen

Embryonen vom 11. Bebrütungstage werden, ohne Kopf und Beine, mit der Schere in 1-2 mm große Stückchen zerschnitten, im 50ml-Erlenmeyerkolben einige Male in PBS gewaschen, darauf in 10ml Ferment 20 Min. lang bei 37° C ruhigstehend inkubiert. Nach der Methode von Shu (1962) wird nun das Ferment durch Nährlösung ersetzt und das Gewebe darin mit der Kapillarpipette scharf auf und ab pipettiert, wobei es rasch und ziemlich vollständig in Einzelzellen und kleinere Zellkomplexe zerfällt.

c. Trypsinierung von Nieren erwachsener Meerschweinchen

Die Niere wird dekapsuliert, die Rinde mit der Schere in 2 mm große Stücke zerkleinert, mehrere Male in PBS gewaschen und im Wasserbad bei 32° C mit 25 ml Fermentlösung für 30 Min. inkubiert. Danach wird kurz und kräftig geschüttelt, der Überstand verworfen und durch neues Ferment gleicher Temperatur ersetzt. Nun wird alle 10 bis 15 Min. kurz und kräftig geschüttelt, der Überstand im Kühlschrank in einem Kolben mit 50 ml Nährlösung und 20% Kälberserum aufgefangen und neues Ferment zugegossen.

Nach Abschluß der Trypsinierung wird der gesammelte Überstand bei 800 U/Min 5 Minuten lang zentrifugiert, das Sediment in Nährlösung suspendiert und ausgesät. Am nächsten Tag muß der Überstand durch neues Nährmedium ersetzt werden.

#### d. Stammzellen

Gelegentlich wurde zum Vergleich mit HeLa-, FL-, MK-Zellen sowie mit Amnionprimär- und Subkultur gearbeitet.

### 3. Methoden der Auswertung

#### a. Zellzählung und Färbung

Die gewonnenen Zellen wurden im Hämocytometer nach Fuchs-Rosenthal gezählt, meist wurde eine Doppelbestimmung aus zwei verschiedenen Proben vorgenommen.

Zur Ermittlung des Anteils toter Zellen wurde nach Pappenheimer (1917) mit Trypanblau gefärbt, und zwar wurde zu 1 ml der Zellsuspension 0,5 ml einer 0,5prozentigen Trypanblaulösung zugesetzt, gemischt und nach 10 Minuten die angefärbten Zellen gezählt.

#### b. Planimetrie

Die Zellausbeute ist auf die Flächeneinheit bezogen worden, weil das Gewicht beim Amnion einen schlechten Anhalt bietet. Zur Feststellung der Größe der Haut wurde das Amnion zwischen zwei Plastikfolien konstanten Gewichtes ausgebreitet. Die Konturen wurden durchgepaust, ausgeschnitten, gewogen und auf den Flächeninhalt umgerechnet. Außerdem wurden die Häute mikroskopisch auf Aussehen und verbliebene Zellen untersucht.

#### c. Allgemeine Beurteilung der Güte und des Wachstums der gewonnenen Zellen.

Die Schalen wurden täglich unter dem Mikroskop betrachtet. Beurteilt wurde das Verhältnis am Boden abgesetzter Zellen zu denen im Überstand, das Aussehen, der Eintritt und Fortgang des Wachstums, die Zeit bis zur Ausbildung eines Zellrasens, Gleichförmigkeit der Epithelzellen,

Granulierung und Vakuolenbildung, sowie die Haltbarkeit der Kultur.

Diese Merkmale lassen sich kaum gemeinsam zahlenmäßig erfassen und so wurden sie nach einem Notensystem beurteilt, bei dem die Zahlen 1-7 verwendet wurden:

- 1 Praktisch alle Zellen abgesetzt, anderntags reichliches Wachstum, nach 3-4 Tagen geschlossener Zellrasen (bei einer Einsaat von 320-350000 Zellen/ml), Zellen gleich groß, polygonal, klares Zytoplasma, nicht granuliert, keine Klumpenbildung.
- 2 Bis zu 20% der Zellen im Überstand, sonst gutes Aussehen, evtl. etwas verspätetes Einsetzen des Wachstums (bis zu 48 Std) Zellrasen nach 4-5 Tagen, morphologisch einheitlich und klar.
- 3 Bis zu 30% der Zellen im Überstand. Die abgesetzten Zellen zeigen gute Proliferation. Wachstum evtl. etwas ungleichförmig. Einzelzelle ohne Granulierung im Plasma. Geschlossener Zellrasen in spätestens einer Woche.
- 4 50-60% der Zellen im Überstand, der Rest zeigt bis spätestens 48 Std. nach der Aussaat deutliches Wachstum. Zellen oft granuliert, erholen sich aber nach einigen Tagen. Häufig setzt verstärktes Wachstum ein und ergibt im Laufe der zweiten Woche einen guten Zellrasen.
- 5 Höchstens 25% der Zellen abgesetzt. Wenig und verspätetes Wachstum, nach einer Woche einzelne kleine Epithalinseln, schließen sich manchmal nach Wochen noch zu einem Zellrasen, sind aber unbrauchbar.
- 6 Einzelne Zellen abgesetzt, kein Zellrasen zu erwarten, unbrauchbar.
- 7 Alle Zellen im Überstand oder primär nur Detritus gewonnen.

- I. Allgemeine Bedingungen der Zellisolierung mit Trypsin Difco 1:250 0,2% in PBS als Standardfermentlösung.

Um die auftretenden Unterschiede in Ausbeute, Wachstum usw. auf die verschiedenartige Wirkung der einzelnen Fermente zurückführen zu können, müssen zunächst die Abweichungen, die durch das Ausgangsmaterial und die Art der übrigen Verarbeitung bedingt sind, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Trypsin Difco 1:250 in 0,2%iger Lösung in PBS als Standardferment benutzt und die übrigen Versuchsbedingungen nacheinander variiert. Zu jedem Versuch wurde eine Placenta in möglichst gleiche Teile geteilt, diese unter den angegebenen Bedingungen verarbeitet und die Ergebnisse verglichen.

- A. Unterschiede, die durch das verarbeitete Gewebe bedingt sind.

1. Unterschiede zwischen den einzelnen Amnionhäuten

Es wurden 115 Amnionhäute verarbeitet. Dabei ergaben sich in 70% der Fälle sehr gute und gute Ergebnisse. 22 % wiesen mehr tote Zellen als üblich oder ein schlechteres Wachstum auf, waren aber brauchbar und konnten nach einer etwas längeren Züchtungszeit weiterverwendet werden. Nur 8% der Häute waren unbrauchbar, so daß die angelegten Kulturen am nächsten Tag verworfen werden mußten. In einem Fall fand sich eine Eihaut praktisch ohne Epithelzellen, was auch Dunnebacke und Zitcer (1957) einmal beobachteten.

Ein Amnion, das keine brauchbaren Zellen liefert, erkennt man häufig schon an einem gedunsenen Aussehen, an einer glasig gequollenen, mit der Pinzette kaum zu fassenden Zwischenschicht, an weichen, gelblichen Anhängen und einer hämolytisch-bräunlichen Verfärbung. Ei-

ne grüne Verfärbung kommt durch Mekonium zustande und besagt wenig über die Brauchbarkeit der Zellen. Allerdings stammen diese Eihäute oft von übertragenen Kindern, und das Epithel ist lockerer, die Zellen leichter zu schädigen, so daß sich kurze Trypsinierungszeiten empfehlen.

Ein helles, gleichmäßig dickes Amnion, das dem Chorion noch fest aufsitzt, wird meist gute Ergebnisse liefern, nur kann es mitunter schwer sein, alle Zellen zu entfernen und Einzelzellen zu erhalten. Es muß ausreichend lange trypsiniert werden.

Der Zellertrag liegt bei 200-400000 Zellen pro  $\text{cm}^2$ . 600-650000 Zellen/ $\text{cm}^2$  entsprechen einer maximalen Ausbeute und werden selten erreicht. Umgerechnet auf den Gesamtertrag einer Haut erhält man durchschnittlich 350-400  $\times 10^6$  Zellen, in Einzelfällen bis zu 600  $\times 10^6$ .

Nach Pappenheimer (1917) sind die mit Trypanblau angefärbten Zellen tot. Diese Färbung verschafft auf einfache Art einen Überblick über die Güte der frisch gewonnenen Zellen, jedoch lassen sich mit ihr keine zuverlässigen Angaben über das weitere Verhalten der Zellen in vitro machen. Es kommt vor, besonders bei der Arbeit mit calciumfreien Fermentlösungen, daß in der Zählkammer kaum angefärbte Zellen zu finden sind, die Zellen aber nach der Aussaat zu großen Gerinnseln verkleben und keine Tendenz zeigen, sich am Boden abzusetzen. Umgekehrt kann eine Zellausbeute mit einem hohen Prozentsatz angefärbter Zellen ein ausgezeichnetes Wachstum aufweisen und in kurzer Zeit einen gleichmäßigen, geschlossenen Zellrasen bilden. Im allgemeinen entsprechen aber die mit der Trypanblaufärbung gewonnenen Ergebnisse und das spätere Wachstum einander. Nach den eigenen Beobachtungen sind Werte bis zu 5% angefärbter Zellen als gut, solche bis zu 15% als tragbar zu bezeichnen. Ein Ansteigen über 20% angefärbter Zellen hinaus ist schlecht.

Gute Zellen setzen sich bald nach der Aussaat am Boden ab, was schon nach wenigen Minuten erfolgt sein kann. Diejenigen, die sich am nächsten Tag noch im Überstand finden, sind verloren, wie auch Lehmann-Grube (1961) feststellte. Sie setzen sich auch bei erneuter Aussaat nicht ab, selbst wenn sie ausgesprochen gut aussehen. Bei sehr vitalen guten Zellen stellt man 4-6 Stunden nach der Aussaat das erste Wachstum fest. Nach 24 Stunden ist der größte Teil ausgewachsen. Es kommt aber auch vor, daß 24 Stunden lang Stillstand herrscht und erst danach ein ganz normales Wachstum einsetzt.

## 2. Unterschiede der Zellausbeute und -güte auf verschiedenen Stellen des selben Amnions.

Man kann beim Amnion deutlich zwei verschiedene Gebiete unterscheiden: den der Placenta direkt aufsitzenden dicken zentralen Bezirk und den peripheren dünnen Teil auf dem freien Chorion. Läßt man eine Haut mehrere Stunden in wenig Nährmedium liegen (Indikator Phenolrot), so ist schließlich die Mitte viel gelber d. h. saurer d. h. stoffwechselaktiver als die Peripherie. Trypsiniert man beide Teile gemeinsam und schüttelt getrennt aus, so ergibt sich folgendes:

Tab. 1

| Amnion | Zellzahl $\times 10^3/\text{cm}^2$ |         | % gefärbt |         | Wachstum |         |
|--------|------------------------------------|---------|-----------|---------|----------|---------|
|        | Mitte                              | Periph. | Mitte     | Periph. | Mitte    | Periph. |
| 1      | 426                                | 110     | 6         | 27      | 2        | 4       |
| 2      | 340                                | 104     | 5         | 15      | 1        | 2       |
| 3      | 585                                | 143     | 17        | 21      | 3        | 5       |
| 4      | 200                                | 78      | 6         | 5       | 2        | 2       |
| 5      | 297                                | 164     | 6         | 17      | 1        | 2       |

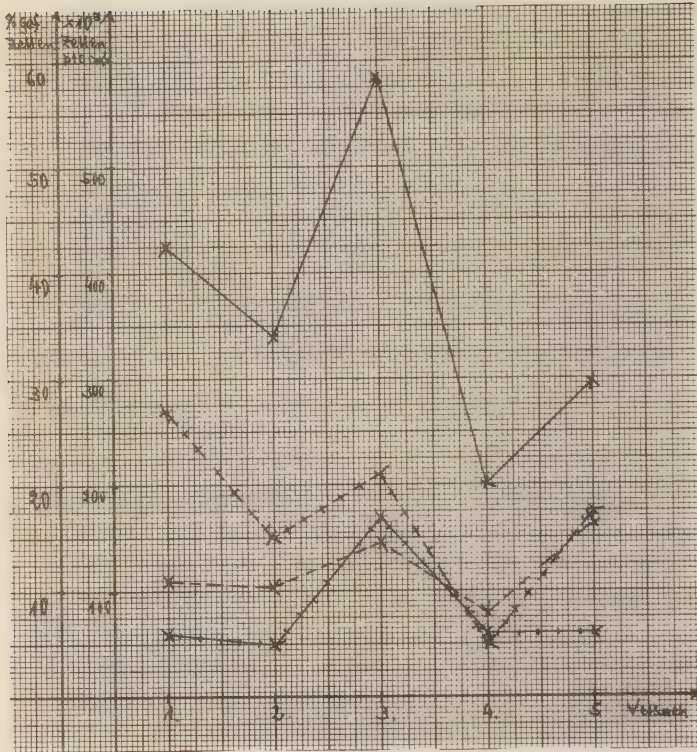


Fig. 1  
zu Tabelle 1  
Verhältnis von  
Mitte und Periphe-  
rie nach  
Zellausbeute  
und toten Zellen

—: Mitte  
---: Peripherie  
==: Ausbeute  
\*\*\*: gefärbte Zellen

Die Zellausbeute war in diesen 5 Versuchen im Durchschnitt in der Mitte etwa dreimal so hoch wie in der Peripherie, die Zahl toter Zellen umgekehrt in 4 von 5 Fällen bedeutend geringer. Das Wachstum war in allen Fällen in der Mitte deutlich besser.

Unter dem Mikroskop sieht man die Zellen der zentralen Partie sehr viel dichter gepackt und auch nach längerer Trypsinierung meist nicht restlos entfernt. Die Peripherie ist nach der Behandlung gewöhnlich kahl und zeigt nur noch die Kerne der Stromazellen.

Ob die Unterschiede auf einer besseren und längerdauernden Blutversorgung der zentralen Partie und einer stärkeren mechanischen Beanspruchung der peripheren beruhen,

ist nicht sicher. Petry und Damminger beschreiben 1956 für die verschiedenen Bezirke des Amnions Epithelien ganz unterschiedlicher Morphologie und möglicherweise auch verschiedener Funktion. Ebenso befassen sich die Arbeiten von Bautzmann und Schröder (1955) und Petry und Zuleger (1958) mit der Deutung solcher morphologischer Unterschiede des Amnionepithels.

3. Der Einfluß von Art und Dauer der Aufbewahrung des Amnions vor der Verarbeitung auf Zellausbeute und Wachstum
- Wird die Placenta nicht sofort nach der Geburt weiterverarbeitet, so kann sie in PBS aufbewahrt werden. Die folgenden Versuche sollten feststellen, ob es besser ist, die Placenta in toto aufzuheben oder das Amnion sofort abzulösen und in PBS zu legen, um eventuell Schädigungen durch den größeren Sauerstoff- und Nährstoffverbrauch der Placenta auszuschalten. Außerdem sollte die zweckmäßigste Temperatur für die Aufbewahrung herausgefunden werden. Die Häute wurden dabei in einer Schale in PBS so aufgehoben, daß das gut ausgebreitete, von Blutgerinnseln und Mekonium befreite Amnion ca. 1/2 cm unter der Flüssigkeitsoberfläche lag.

Untersucht wurden die Bedingungen

I. Amnion der Placenta fest aufsitzend

II. Amnion abgelöst

bei den Temperaturen  $+4^{\circ}\text{C}$  und  $+20^{\circ}\text{C}$ . (S.Tab.2 und Fig.2 nächste Seite)

Tab. 2 und Fig. 2 zeigen, daß der Anstieg toter Zellen bei Aufbewahrung des der Placenta fest aufsitzenden Amnions bei Zimmertemperatur am geringsten ist. Die Zellen sind selbst nach 48 Stunden Aufbewahrungszeit noch mit gutem Erfolg zu verarbeiten und zeigen wenig Blaufärbung aber gutes Wachstum.

Tab. 2

| Versuch | Art der Aufbewahrg. | Zellzahl $\times 10^3/\text{cm}^2$ |     |     | % gefärbt |    |     | Wachstum |    |    | Std. Aufbe |
|---------|---------------------|------------------------------------|-----|-----|-----------|----|-----|----------|----|----|------------|
|         |                     | 0                                  | 24  | 48  | 0         | 24 | 48  | 0        | 24 | 48 |            |
| 1       | I. 20° C            | 120                                | 173 | 253 | 14        | 9  | 17  | 2        | 2  | 2  |            |
|         | I. 4° C             | 120                                | 164 | 50  | 14        | 52 | 45  | 2        | 4  | 4  |            |
| 2       | I. 20° C            |                                    | 185 | 238 |           | 7  | 11  |          | 1  | 1  |            |
|         | I. 4° C             |                                    | 312 | 400 |           | 19 | 17  |          | 1  | 1  |            |
| 3       | I. 4° C             | 294                                | 344 | 96  | 11        | 29 | 44  | 1        | 3- | 4  |            |
| 4       | I. 4° C             | 350                                | 280 | 205 | 3         | 12 | 30  | 1        | 2  | 4  |            |
| 5       | II. 20° C           |                                    | 296 |     |           | 11 |     |          | 2  |    |            |
|         | II. 4° C            |                                    | 270 |     |           | 78 |     |          | 6  |    |            |
| 6       | II. 20° C           | 147                                | 129 | 394 | 7         | 15 | 23  | 2        | 2  | 2  |            |
| 7       | II. 20° C           | 186                                | 260 | 188 |           | 12 | 17  | 1        | 2  | 3  |            |
| 8       | II. 4° C            | 345                                | 69  | 61  | 22        | 80 | 100 | 2-       | 5  | 7  |            |
| 9       | II. 4° C            | 260                                | 236 | 194 | 17        | 46 | 100 | 1        | 3  | 6  |            |
| 10      | II. 4° C            | 172                                | 139 | 43  | 12        | 39 | 75  | 1        | 3  | 6  |            |

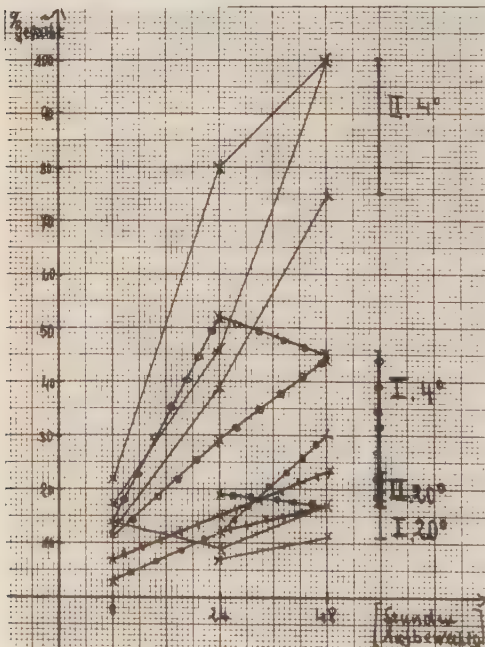


Fig. 2

zu Tabelle 2

Anstieg der Zahl toter Zellen abhängig von der Art der Aufbewahrung der Eihäute vor der Verarbeitung.

I. 20°: Amnion auf Placenta bei 20° C

I. 4°: Amnion auf Placenta bei 4° C

II. 20°: Amnion abgelöst bei 20° C

II. 4°: Amnion abgelöst bei 4° C

Zählung nach 0, 24 und 48 Std. nach der Geburt

Am steilsten steigt der Prozentsatz toter Zellen bei abgelöstem Amnion und Aufbewahrung bei 4°C an. Hier ist schon nach 24 Stunden eine starke Zellschädigung zu verzeichnen, die Methode ist unbrauchbar.

Auch das abgelöste Amnion läßt sich bei Zimmertemperatur noch recht gut halten. Das Epithel wird zwar etwas stärker angegriffen, die Zahl angefärbter Zellen steigt etwas steiler an, jedoch ist diese Art der Aufbewahrung brauchbar, zumal etwa 1/3 aller Häute sich bereits bei der Geburt von Placenta und Chorion teilweise lösen.

Mandin und Pourquier (1957) stellen fest, daß das Amnion schon nach kurzdauerndem Kühlschranksaufenthalt unbrauchbar sei. Das gilt aber, wie der Versuch zeigt, nicht, wenn die Eihäute der Placenta fest aufsitzen. In diesem Fall überstehen die Epithelzellen die niedrigen Temperaturen in befriedigendem Zustand.

Zusammengefaßt ergibt sich aus diesen Beobachtungen, daß es am günstigsten ist, die Placenta im ganzen bis zur Verarbeitung bei Zimmertemperatur aufzubewahren.

Im Gegensatz zur abgelösten Amnionhaut lassen sich die bei der Trypsinierung gewonnenen Zellen sehr gut in Nährlösung suspendiert bei 4°C halten, wenn dafür gesorgt wird, daß die Atmung möglich bleibt. Dazu muß die Zellsuspension in einem Erlenmeyerkölbchen mit ca. 1/2 cm Überstand von Nährmedium aufbewahrt werden. Bei Bedarf wird sie aufgeschüttelt und ausgesät. Bei zu großem Überstand und zu dicht gepacktem Sediment sind bereits nach 24 Stunden kaum noch lebende Zellen anzutreffen.

Tab.3

Zunahme des Anteils toter Zellen und Verlauf des Wachstums bei Aufbewahrung der Zellsuspension über mehrere Tage bei 4°C

| Versuch | % angefärbte Zellen |    |    |    | Wachstum |    |    |    |              |
|---------|---------------------|----|----|----|----------|----|----|----|--------------|
|         | o                   | 24 | 48 | 96 | o        | 24 | 48 | 96 | Std. bei 4°C |
| 1       | 17                  | 27 | 50 |    | 1        | 2  | 3  |    |              |
| 2       | 11                  | 20 | 24 | 42 | 1        | 2  | 3  | 4  |              |
| 3       | 9                   | 21 |    |    | 1        | 2  |    |    |              |
| 4       | 9                   | 10 |    |    | 1        | 2  |    |    |              |

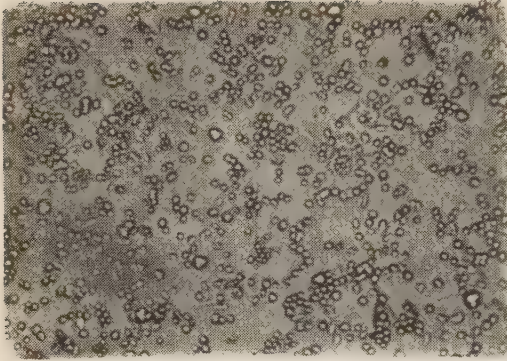


Abb. 1

Amnionprimärkultur 8 Std.  
nach der Aussaat. 320 000  
Zellen/ml.

Beginnendes Wachstum.

Vergr. 1:

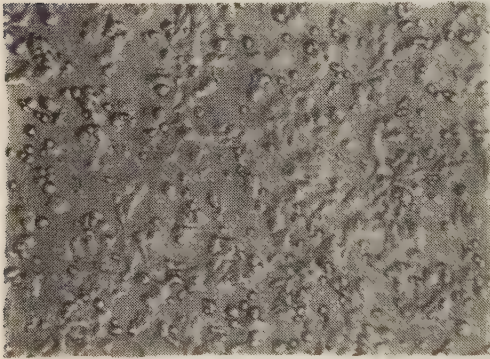


Abb. 2

Amnionprimärkultur.

Zellen aus der Mitte des  
Amnions. 40 Std. nach der  
Aussaat, 350 000 Zellen  
pro ml. Sehr gutes Wachs-  
tum.

Vergr. 1:

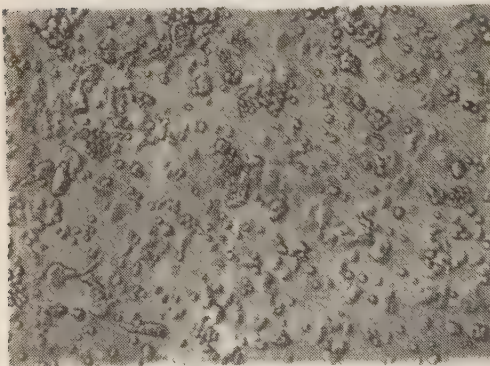


Abb. 3

Amnionprimärkultur.

Gleiches Amnion wie in  
Abb.2 aber Zellen aus der  
Peripherie. 40 Std. nach  
der Aussaat, 350 000 Zel-  
len/ml. Wachstum deutlich  
schlechter als in Abb.2.

Vergr. 1:

## B. Variation der Ergebnisse durch die Art der Ferment- einwirkung

1. Der pH-Wert des Fermentes und seine Wirkung auf Ausbeute und Prozentsatz toter Zellen.

Die meisten Autoren geben bei Arbeiten mit Trypsin in der Gewebekultur ein pH von 7,2 bis 7,8 an (z. B. Scheerer, Syverton und Gey 1953, Youngner 1954, St. Amand und Tipton 1954, Lahelle 1956, Syverton und McLaren 1957, L. Weiss 1958, Slonim, Cinnerová, Drěvo, Michl und Marěs 1961). Haff und Swim (1956) arbeiteten bei 7,9 - 8,3, Moscona und Moscona (1952) ließen den pH-Wert während der Trypsinierung langsam auf 8,4 bis 8,6 ansteigen.

Das pH-Optimum für Trypsin liegt zwischen 7,8 und 8,7. Das gilt für das gereinigte Ferment mit Casein oder Gelatine als Substrat. Von rohen Zubereitungen und Fermentgemischen ist bekannt, daß sich die einzelnen Fermentkomponenten gegenseitig beeinflussen. Die in der Gewebekultur verwendeten Fermente sind zumeist solche mehr oder weniger angereicherten Organextrakte. Aber auch das Substrat ist hier kein einheitlicher Eiweißkörper bekannten Aufbaus wie Casein oder Gelatine. Schließlich ist Trypsin wahrscheinlich nicht das einzige Ferment, auch in relativ reinen Pankreasauszügen, das bei der Zellisolierung beteiligt ist. Dafür spricht schon, daß bei Verwendung von kristallisiertem Trypsin verhältnismäßig größere Mengen benötigt werden als bei rohen Zubereitungen. (Slonim, Cinnerová, Drěvo, Michl und Marěs 1961, Rinaldini 1959). Außerdem kann der pH-Wert mit Rücksicht auf den Stoffwechsel der lebenden Zelle nicht beliebig variiert werden. Darum soll das pH-Optimum für die hier gegebenen Voraussetzungen noch einmal neu bestimmt werden.

In 5 Versuchen wurden je 4 Werte von pH 7 - 9,5 nach Zellausbeute, Prozentsatz angefärbter Zellen und Wachstum miteinander verglichen. Tab. 4 und Fig. 3 und 4 siehe Seite 18 und 19.

Tab. 4

Einfluß des pH-Wertes bei der Trypsinierung auf Zellausbeute, Prozentsatz toter Zellen und Wachstum

| pH  | Zellzahl x 10 <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup> |     |     |     |     | % gefärbte Zellen |    |    |    |    | Wachstum |    |    |    |            |
|-----|---------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|----|----|----|----|----------|----|----|----|------------|
|     | 1.                                          | 2.  | 3.  | 4.  | 5.  | 1.                | 2. | 3. | 4. | 5. | 1.       | 2. | 3. | 4. | 5. Versuch |
| 7   | 7o                                          | 32  |     |     |     | 2o                | 24 |    |    |    | 3        | 4  |    |    |            |
| 7,2 |                                             |     | 6o  |     |     |                   |    | 2o |    |    |          |    | 2  |    |            |
| 7,3 |                                             |     |     | 323 | 22o |                   |    |    | 5  | 7  |          |    |    | 1  | 1          |
| 7,4 |                                             |     | 243 |     |     |                   |    | 15 |    |    |          |    | 2  |    |            |
| 7,6 | 21o                                         | 3o7 | 236 | 32o | 32o | 1o                | 13 | 8  | 3  | 3  | 1        | 1  | 1  | 1  | 1          |
| 8   | 182                                         | 225 |     |     |     | 14                | 15 |    |    |    | 1        | x  |    |    |            |
| 8,2 |                                             |     | 264 |     |     |                   |    | 15 |    |    |          |    | 2  |    |            |
| 8,5 | 12o                                         | 231 |     | 168 | 25o | 1o                | 34 |    | 11 | 6  | 2        | x  |    | 2+ | 1          |
| 9   |                                             |     |     |     | 414 |                   |    |    |    | 14 |          |    |    |    | 2          |
| 9,5 |                                             |     |     | 19o |     |                   |    |    | 54 |    |          |    |    | 3  |            |

x nicht ausgesät

Aus Tab.4 und Fig. 3 und 4 ergibt sich, daß das pH-Optimum bei der Zellisolierung mit Trypsin bei pH 7,6 liegt. Bei diesem Wert ist der Prozentsatz toter Zellen am geringsten, die Zellausbeute zeigt einen Gipfel, und das Wachstum ist optimal.

Der Anstieg der Zellzahl bei pH 8,2 und 9 ist uninteressant, da diese Zellen deformiert und geschädigt sind.

Überraschend ist aber der steile Anstieg der Ausbeute zwischen pH 7,2 und 7,3, dem nach der alkalischen Seite zu ein viel langsamerer Abfall entspricht.

Die Kurven des Anstieges der Zellausbeute und des Abfalles der Zahl toter Zellen entsprechen einander etwa spiegelbildlich.

Fig. 3 und 4 zu Tab. 4

Fig. 3 pH-Wert und Zellausbeute

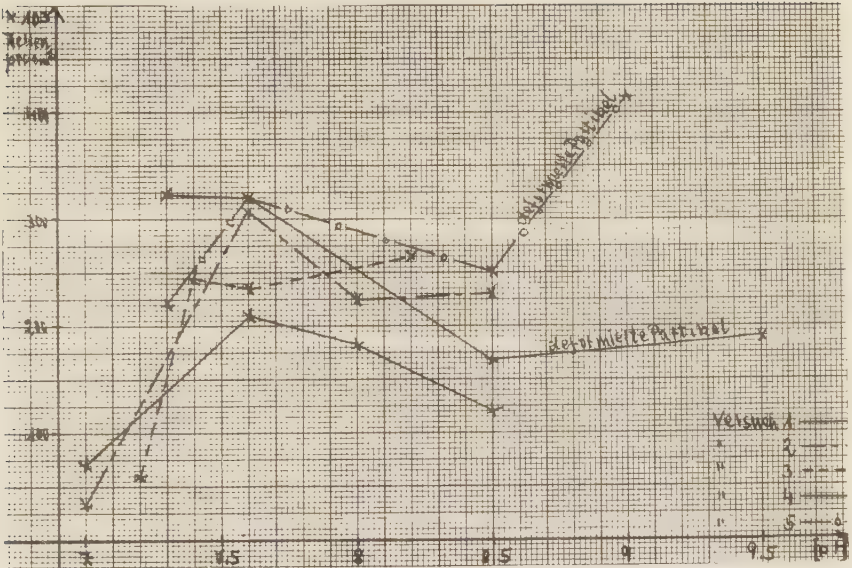


Fig. 4 pH-Wert und Prozentsatz angefärbter Zellen



Die günstigste pH-Einstellung der Trypsinlösung für die Isolierung von Amnionepithelzellen liegt demnach zwischen pH 7,4 und pH 8, wobei nach der alkalischen Seite hin mehr Spielraum besteht als nach der sauren. Unterhalb pH 7,3 sind kaum noch brauchbare Ergebnisse zu erwarten.

## 2. Der Einfluß der Trypsinierungszeit auf die Zellisolierung

Die Schwierigkeit, beim Amnion auf schonende Weise eine maximale Zellausbeute zu erreichen, besteht darin, daß es meist nicht gelingt, die dichtgepackten Zellen der zentralen Partie, die eine besonders große Ausbeute und das beste Wachstum ergeben, restlos zu entfernen. Es soll untersucht werden, wie weit sich besonders diese Zellen durch verlängerte Fermenteinwirkung gewinnen lassen.

Die längere Trypsineinwirkung bringt jedoch das Risiko mit sich, daß die Zellen durch das Ferment stärker geschädigt werden. Weiterhin kann die Verdauung so weit fortgeschritten sein, daß sich die Amnionzellen in der Trypsinlösung vorzeitig von der Haut lösen und verlorengehen.

In zwei orientierenden Vorversuchen wurde 120 und 180 bzw. 90 und 150 Minuten lang trypsiniert. Es ergab sich in beiden Fällen ein deutlicher Anstieg der Zellausbeute, aber zugleich eine steile Zunahme der Zahl toter Zellen von 11,5 auf 50 bzw. von 21 auf 57 Prozent. Das Wachstum sprach gleichfalls eindeutig zugunsten kürzerer Inkubationszeiten. Siehe Fig. 6 Seite 23.

Spätere Versuche mit einer anderen Charge Trypsin brachten aber ganz andere Resultate, wie Tab. 5 und Fig. 5 und 6 zeigen.

Es wurden 5 Versuche mit je 4 verschieden langen Trypsinierungszeiten angesetzt und die Ergebnisse nach Zellausbeute, Prozentsatz toter Zellen und Wachstum beurteilt.

Tab. 5

| Trypsin.<br>zeit in<br>Minuten | Zellzahl $\times 10^3/\text{cm}^2$ |     |     |     |     | % gefärbte Z. |    |    |    |    | Wachstum |    |    |    |          |
|--------------------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|---------------|----|----|----|----|----------|----|----|----|----------|
|                                | 1.                                 | 2.  | 3.  | 4.  | 5.  | 1.            | 2. | 3. | 4. | 5. | 1.       | 2. | 3. | 4. | 5. Vers. |
| 60                             | 74                                 |     |     |     |     | 50            |    |    |    |    | 6        |    |    |    |          |
| 90                             | 81                                 |     |     | 186 | 272 | 15            |    |    | 8  | 4  | 3        |    |    | 2  | 2        |
| 120                            |                                    | 105 | 388 |     |     |               | 18 | 5  |    |    |          | 3- | 1  |    |          |
| 135                            |                                    |     |     | 202 |     |               |    |    | 9  |    |          |    |    | 2+ |          |
| 150                            | 153                                |     |     |     |     | 9             |    |    |    |    | 2-       |    |    |    |          |
| 180                            |                                    | 111 | 405 |     |     |               | 21 | 7  |    |    |          | 2  | 1  |    |          |
| 210                            | 187                                |     |     | 215 |     | 11            |    |    | 7  |    | 2        |    |    | 1  |          |
| 240                            |                                    | 109 |     |     |     |               | 11 |    |    |    |          | 2- |    |    |          |
| 255                            |                                    |     | 547 |     |     |               |    | 13 |    |    |          |    | 1  |    |          |
| 300                            |                                    |     |     | 215 |     |               |    |    | 6  |    |          |    |    |    | 1        |
| 310                            |                                    | 124 |     |     |     |               | 15 |    |    |    |          | 2- |    |    |          |
| 360                            |                                    |     |     | 290 |     |               |    |    | 9  |    |          |    |    | 1  |          |
| 425                            |                                    |     | 475 |     |     |               |    | 10 |    |    |          |    | 1  |    |          |
| 490                            |                                    |     |     |     | 133 |               |    |    |    | 13 |          |    |    |    | 2        |

Bei 60 Minuten Einwirkungszeit lösen sich praktisch nur die bereits toten Zellen und große Zellkomplexe. Nach 90 Min. kann mit brauchbaren Ergebnissen gerechnet werden, aber die größte Zellausbeute wird erst nach 4-6 Stunden erreicht. Danach sinkt die Zellzahl, weil sich die Zellen vorzeitig von der Haut ablösen und nicht mehr in die Nährlösung gebracht werden können. Die Fermentlösung

wird durch die darin suspendierten Zellen trüb. Der Prozentsatz angefärbter Zellen bleibt über viele Stunden hin sehr niedrig und steigt nur ganz allmählich an. Nach 6-7stündiger Trypsinierung zeigen die verbleibenden Zellen noch ein sehr gutes, nach 8 Stunden noch ein gutes Wachstum, wie der Tab. 5 zu entnehmen ist.

Diese Beobachtung spricht aber dafür, daß in den hier angewendeten Konzentrationen die proteolytische Wirkung des Trypsins nicht identisch ist mit der zellschädigenden Wirkung, wie sie häufig in Erscheinung tritt. Die zuvor erwähnte erste Trypsincharge enthielt offenbar für die Zellen toxische Beimengungen, die sich bei längerer Inkubation stark schädigend bemerkbar machten, während die zweite frei davon war. Das stimmt sehr gut mit den Beobachtungen von Northrop (1947) und denjenigen von L. Weiss (1958) überein.

Man kann also durch längere Trypsinierungszeiten die Ausbeute steigern, sofern man sich vorher davon überzeugt hat, daß das verwendete Trypsin auf das zu verarbeitende Gewebe nicht toxisch wirkt. Muß jedoch mit zellschädigendem Ferment gearbeitet werden, empfehlen sich Einwirkungszeiten von etwa 90 Minuten unter Verzicht auf höhere Ausbeute.

S. Fig. 5 und 6 S. 23

Fig. 5 Trypsinierungszeit und Ausbeute

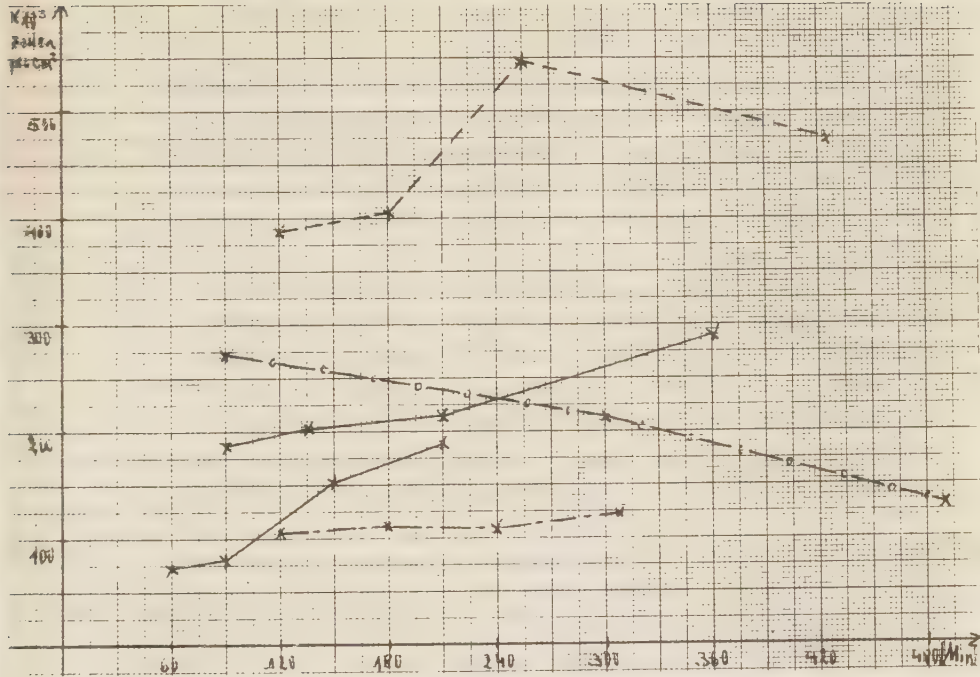
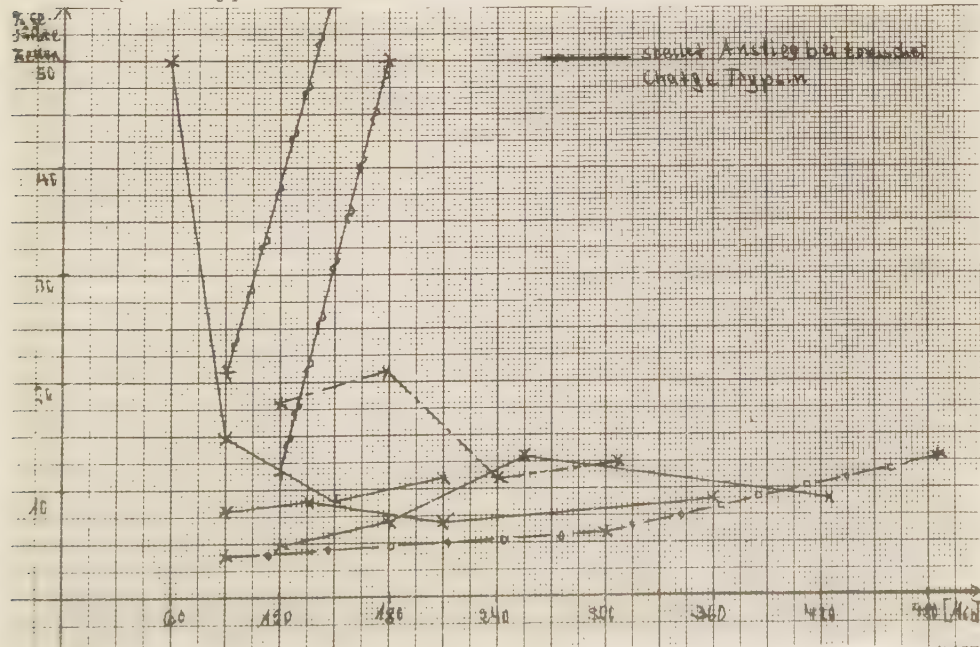


Fig. 6 Trypsinierungszeit und Prozentsatz angefarbter Zellen



### 3. Die Konzentration des Fermentes und ihr Einfluß auf Ausbeute und Güte der Zellen

Unter der Vorstellung, daß die niedrigste noch brauchbare Konzentration des Fermentes die unschädlichste sei und eventuelle toxische Beimengungen dort vielleicht die schädigende Schwelle unterschritten hätten, wurden die Konzentrationen 0,2, 0,15 und 0,1% Trypsin Difco 1:250 untersucht.

Wie Tabelle 6 zeigt, ist 0,1% zu schwach. Man erhält Zellkomplexe, eine geringe Ausbeute, verhältnismäßig viele tote Zellen und ein ungenügendes Wachstum. Zwischen 0,2% und 0,15% ist kein eindeutiger Unterschied festzustellen, sofern man den Konzentrationsunterschied durch 30-45 Minuten längere Trypsineinwirkung ausgleicht. Im Aussehen sind die mit 0,15%igem Trypsin gewonnenen Kulturen gleichförmig und klar.

Auffallend ist in den Versuchen 2 - 6 der hohe Prozentsatz angefärbter Zellen. Es wurde hier mit der gleichen Trypsincharge gearbeitet, die in der vorigen Versuchsreihe als toxisch bezeichnet wurde.

Tab. 6 s. S. 25

Zur Bestimmung der oberen verträglichen Fermentkonzentration wurden in einigen Versuchen 0,3%ige und 0,5%ige Trypsinlösung mit dem 0,2%igen Standardferment verglichen. Tab. 7 S. 25

Tab. 6

Bestimmung der niedrigsten noch wirksamen Trypsinkonzentration

| Vers. | Tryps.zeit | Fermentkonz. | Zellzahl $\times 10^3 / \text{cm}^2$ | %gefärbt | Wachstum |
|-------|------------|--------------|--------------------------------------|----------|----------|
| 1     | 90'        | 0,20%        | 430                                  | 7        | 2+       |
|       | 90'        | 0,15%        | 337                                  | 8        | 2        |
|       | 90'        | 0,10%        | 187                                  | 8        | 3        |
| 2     | 90'        | 0,20%        | 285                                  | 24       | 5        |
|       | 135'       | 0,10%        | 190                                  | 60       | 6        |
| 3     | 90'        | 0,20%        | 278                                  | 16       | 3        |
|       | 135'       | 0,15%        | 296                                  | 18       | 2        |
| 4     | 110'       | 0,20%        | 270                                  | 26       | 3-       |
|       | 140'       | 0,15%        | 290                                  | 21       | 2        |
| 5     | 110'       | 0,20%        | 383                                  | 29       | 2        |
|       | 155'       | 0,15%        | 237                                  | 30       | 2        |
| 6     | 100'       | 0,20%        | 403                                  | 16       | 2        |
|       | 150'       | 0,15%        | 315                                  | 20       | 2        |
| 7     | 90'        | 0,20%        | 360                                  | nicht    | 2        |
|       | 135'       | 0,15%        | 555                                  | gefärbt  | 2+       |

Tab. 7

Bestimmung der höchsten gut verträglichen Konzentration

| Versuch | Fermentkonzentr. | Zellzahl $\times 10^3 / \text{cm}^2$ | %gefärbt | Wachstum |
|---------|------------------|--------------------------------------|----------|----------|
| 1       | 0,2%             | 340                                  | 8        | 2        |
|         | 0,3%             | 272                                  | 10       | 1        |
| 2       | 0,2%             | nicht gezählt                        | 20       | 3        |
|         | 0,3%             | " "                                  | 13       | 1        |
| 3       | 0,2%             | 245                                  | 24       | 2        |
|         | 0,5%             | 326                                  | 29       | 3        |
| 4       | 0,2%             | 208                                  | 15       | 2        |
|         | 0,5%             | 260                                  | 20       | 4        |
| 5       | 0,2%             | 284                                  | 7        | 2        |
|         | 0,5%             | 272                                  | 6        | 2        |
| 6       | 0,2%             | 272                                  | 6        | 2        |
|         | 0,5%             | 408                                  | 3        | 3        |

Wie Tab. 7 zeigt, ist 0,3%iges Trypsin gut brauchbar. Das Wachstum ist bei dieser Konzentration sogar besser als bei 0,2%. Bei 0,5% scheint der Übergang zu schädigenden Konzentrationen zu liegen, da die etwas höhere Ausbeute hier bereits durch ein schlechteres Wachstum ausgeglichen wird. Die optimale Konzentration dürfte unter den angegebenen Bedingungen zwischen 0,2% und 0,4% liegen. 0,2% wurde als ausreichend beibehalten.

#### 4. Die Trypsinierung bei verschiedenen Temperaturen

In der Literatur finden sich folgende Angaben zu Trypsinierungszeit und -temperatur:

Tab. 8

| Autor                 | Material   | Temperat. | Tryps.zeit | Trypsin | Technik      |
|-----------------------|------------|-----------|------------|---------|--------------|
| Bodian 1956           | Affenniere | 4°        | 6 Std      | 0,25%   | Magnetrührer |
| " "                   | "          | 22-26°    | 2 "        | "       | "            |
| Daniel 1957           | "          | 4°        | 16-20 "    | "       | "            |
| Dunnebacke            | Amnion     | 37°       | 2-3 "      | "       | geschüttelt  |
| " 1957                | "          | 22°       | 3-4 "      | "       | "            |
| " "                   | "          | 22°       | üb.Nacht   | 0,10%   | ruhigstehend |
| Lahelle 1956          | "          | 30°       | 3 Std      | 0,25%   | "            |
| Lehmann-Grube<br>1961 | "          | 32°       | 4 "        | "       | "            |
| Lennartz 1958         | "          | 37°       | 1,5 "      | "       | geschüttelt  |
| Mandin 1957           | "          | 33°       | 5 "        | 3,00%   | ruhigstehend |
| Takemoto 1957         | "          |           | 6-14 "     | 0,25%   | Magnetrührer |
| Weinstein 1956        | "          | 22°       | 4,5-6 "    | "       | ruhigstehend |

Da die Trypsinierungszeiten und -temperaturen in Tab. 8 so starke Unterschiede aufweisen, soll in den folgenden Versuchen der Einfluß der Temperatur auf die Zellisolierung untersucht werden. Die Dauer der Trypsinierungszeit wurde bereits auf Seite 21 behandelt.

Es wurde bei den Temperaturen + 4°, +22°, +33° und +37° C während der jeweils angegebenen Zeit inkubiert.

Tab. 9 S. 27

Tab. 9

| Versuch | Temperatur | Tryps.zeit | Zellzahl $\times 10^3/\text{cm}^2$ | %gefärbt | Wachstum |
|---------|------------|------------|------------------------------------|----------|----------|
| 1       | 37°C       | 2 Std      | 254                                | 8        | 1        |
|         | 4°C        | 24 "       | 97                                 | 90       | 6        |
|         | Suspension |            |                                    | 10       | 2        |
| 2       | 37°C       | 2 "        | 320                                | 10       | 1        |
|         | 4°C        | 17 "       | 148                                | 31       | 3        |
|         | Suspension |            |                                    | 21       | 2        |
| 3       | 37°C       | 2 "        | 282                                | 7        | 1        |
|         | 22°C       | 5,5"       | 204                                | 6        | 1        |
|         | 4°C        | 8,5"       | 74                                 | 38       | 5        |
|         | Suspension |            |                                    | 9        | 2        |
| 4       | 37°C       | 2 "        | 231                                | 9        | 1        |
|         | 33°C       | 4 "        | 270                                | 21       | 2        |
|         | 22°C       | 8 "        | 194                                | 31       | 4        |
| 5       | 37°C       | 2,25"      | 380                                | 11       | 1        |
|         | 33°C       | 3 "        | 275                                | 7        | 1        |
|         | 22°C       | 7 "        | 211                                | 14       | 1        |
| 6       | 37°C       | 1,75"      | 129                                | 15       | 2        |
|         | 33°C       | 3,25"      | 154                                | 9        | 1        |
|         | 22°C       | 5,75"      | 178                                | 19       | 2        |
| 7       | 37°C       | 2 "        | 238                                | 11       | 1        |
|         | 33°C       | 5 "        | 226                                | 12       | 1        |
| 8       | 37°C       | 3 "        | 260                                | 12       | 3        |
|         | 33°C       | 6 "        | 420                                | 10       | 2        |

Die Anmerkung Suspension in der Tabelle bedeutet, daß die bei 37° C gewonnene Zellsuspension ebenso lange im Kühlschrank aufgefroren wurde, wie das bei 4° C inkubierte Amnion, und anschließend tote Zellen und Wachstum beurteilt wurden.

Wie die Tabelle zeigt, ist die Trypsinierung bei Kühlschranktemperatur für das Amnion ungeeignet, da die Zellen danach

schwer geschädigt sind. Dagegen vertragen bereits isolierte in Nährlösung suspendierte Zellen die niedrige Temperatur recht gut. Die Zellisolierung bei Zimmertemperatur ( $22^{\circ}\text{C}$ ) brachte in 4 Versuchen eine höhere Zahl toter Zellen und in 3 von 4 Fällen eine geringere Ausbeute als der Vergleichswert bei  $37^{\circ}$ . Das Verfahren ist außerdem durch die erforderlichen langen Inkubationszeiten im Arbeitsablauf unpraktisch und bietet keinerlei Vorteile. Die Ergebnisse bei  $33^{\circ}\text{C}$  und bei  $37^{\circ}\text{C}$  sind etwa gleich gut. Schädigungen, in Form von hohen Totenzahlen bei nur kurzer Fermenteinwirkung bei  $37^{\circ}$ , wie sie Lahelle 1956 beschreibt, und die ihn veranlaßten, bei  $30^{\circ}$  zu arbeiten, konnten nicht beobachtet werden.

## II. Verschiedene Reinheitsgrade und Zubereitungen des Trypsins. Andere Fermente und Komplexbildner.

Man kann die in der Literatur für ein Gewebe beschriebenen Isolierungsmethoden nicht ohne weiteres auf eine andere Gewebsart übertragen. Einmal zeigen die einzelnen Fermente eine engere oder weitere Substratspezifität, also je nach der aufzulösenden Interzellulärsubstanz eine unterschiedliche Brauchbarkeit in qualitativer Hinsicht (Rinaldini 1958, Hinz 1959). Aber auch bei dem gleichen Gewebe finden sich, z.B. je nach Alter, große Unterschiede quantitativer Art, die erforderlichen Fermentkonzentrationen sind verschieden hoch. Sehr häufig werden die Zellen embryonaler Hühnchen gezüchtet. Dieses Gewebe ist so weich, daß es bereits mechanisch zu brauchbaren Suspensionen zerkleinert werden kann, indem man es durch Drahtgaze preßt. Läßt man es einige Zeit in calciumfreier Pufferlösung liegen, so wird es noch weicher (Moscona 1952), und zur endgültigen Gewinnung von Einzelzellen sind nur geringe Fermentmengen erforderlich. Andererseits hat das embryonale Gewebe eine starke Wachstumstendenz, so daß Schädigungen schon sehr schwer sein müssen, um deutliche Unterschiede bei der Anlage von Gewebekulturen hervorzurufen.

Zum Vergleich der einzelnen Fermente untereinander wurde zunächst die Titration nach Willstätter (1928) herangezogen. Dabei werden die nach einer bestimmten Zeit aus dem Substrat, Casein oder Gelatine, durch Fermenteinwirkung freigewordenen Aminosäuren mit Lauge zurücktitriert. Es zeigte sich aber, daß die mit dieser Methode auf gleiche tryptische Aktivität gegenüber Casein eingestellten Fermentlösungen am Gewebe verschieden wirksam waren. So ist eine Trypsinzubereitung in calciumfreier Pufferlösung deutlich wirksamer gegenüber dem Amnionepithel als die gleiche Fermentkonzentration in calciumhaltiger Lösung, obwohl sich gegenüber Casein beide gleich verhalten. Die meisten im Handel befindlichen Trypsine enthalten neben Trypsin noch andere proteolytische Fermente, z. B. Elastase, die wohl bei der Zellisolierung, nicht aber bei der Spaltung des Caseins mitwirken. Schließlich beobachteten bereits Simms und Stillman (1937), daß die Wirkungen von Trypsin gegenüber Casein und gegenüber Gewebe bei verschiedenen Temperaturen in keinem konstanten Verhältnis zueinander stehen, sondern daß das Casein bei Zimmertemperatur stärker abgebaut wird, während das Gewebe bei 5°C und bei 36°C einen Anstieg der Empfindlichkeit zeigt. Aus diesen Feststellungen ergibt sich aber, daß man die Brauchbarkeit zweier Fermente nur miteinander vergleichen kann, wenn man sie zuvor auf gleiche Wirksamkeit gegenüber dem entsprechenden Gewebe eingestellt hat, nicht nach ihrer proteolytischen Aktivität gegenüber Casein.

## 1. Verschiedene Reinheitsgrade des Trypsins

### a. Kristallisiertes Trypsin (Böhringer Mannheim)

Als reinste Zubereitung wurde kristallisiertes Trypsin der Firma Böhringer verwendet. In 2 orientierenden Versuchen, die mit 0,1%, 0,05% und 0,025% Ferment in PBS angesetzt wurden, fand sich, daß die Konzentration von 0,05% nach Ausbeute und Prozentsatz toter Zellen der Vergleichslösung von 0,2% Trypsin Difco etwa entspricht. Die Versuche wurden nicht fortge-

setzt, weil das Ferment, obwohl geeignet, für den Routinebetrieb zu teuer ist.

b. Trypsin Difco 1:250

Dieses Ferment wurde in 0,2%iger Lösung der ganzen Arbeit als Vergleichswert zugrundegelegt.

c. Trypsin Merck

In seiner Wirkung gegenüber dem Amnion etwa sechsmal schwächer als Trypsin Difco ist das Trypsin der Firma Merck, wie Tab. 10 und Fig. 7 und 8 zeigen.

In 6 Versuchen wurde je ein Amnion in 2 gleiche Teile geteilt und mit 0,2% Trypsin Difco (TD) bzw. 1,2% Trypsin Merck (TM) inkubiert.

Tab. 10

| Versuch | Zellzahl $\times 10^3/\text{cm}^2$ |     | % gefärbte Zellen |    | Wachstum |    |
|---------|------------------------------------|-----|-------------------|----|----------|----|
|         | TD                                 | TM  | TD                | TM | TD       | TM |
| 1       | 333                                | 359 | 11                | 17 | 1        | 1  |
| 2       | 331                                | 237 | 15                | 12 | 1        | 2+ |
| 3       | 356                                | 340 | 7                 | 14 | 1        | 1  |
| 4       | 325                                | 262 | 7                 | 15 | 1        | 1  |
| 5       | 234                                | 280 | 9                 | 15 | 1        | 2  |
| 6       | 315                                | 384 | 10                | 12 | 1        | 2+ |

Wie die Tabelle zeigt, entsprechen sich die beiden Lösungen in der zellisolierenden Wirkung ungefähr. In 5 von 6 Fällen war der Prozentsatz gefärbter Zellen bei Trypsin Merck höher, in 3 von 6 Fällen das Wachstum etwas schlechter, d. h., es setzten sich weniger Zellen ab, doch wuchsen die einmal abgesetzten normal aus. Das Ferment ist brauchbar, greift aber die Epithelzellen stärker an als Trypsin Difco, was sich besonders dann zeigt, wenn das Amnion übertragen oder bereits mehrere Stunden alt ist.

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse mit Trypsin Merck unregelmäßiger und weniger zuverlässig als mit Trypsin Difco, jedoch ist es auch für den Routinebetrieb noch geeignet.

Trypsin Merck wurde übrigens schon 1916 von Rous und Jones für ihre Zellisolierungen benutzt.

Fig. 7

Verhältnis gefärbter Zellen bei 0,2% Trypsin Difco 1:250 (TD) — und 1,2% Trypsin Merck (TM) — — —

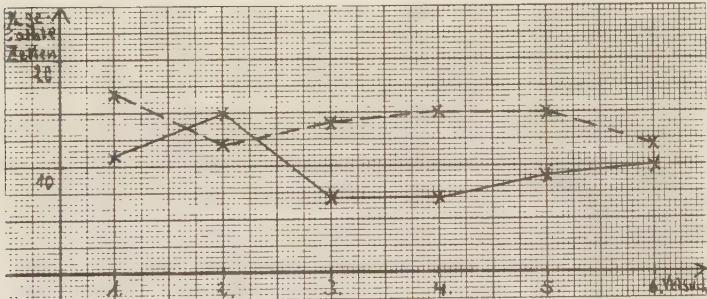
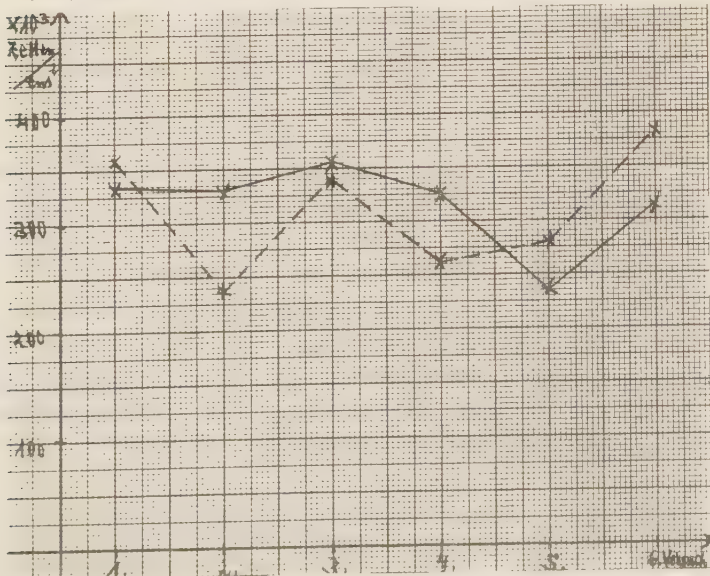


Fig. 8

Verhältnis der Ausbeuten bei Trypsin Difco 0,2% (TD) — und Trypsin Merck 1,2% (TM) — — —



#### d. Pankreatin Merck

Mit Pankreatin Merck wurde in 4 Versuchen eine Ausbeute erzielt, die unter dem Vergleichswert lag. Der Prozentsatz toter Zellen bewegte sich zwischen 70 und 90%. Das Wachstum war in 2 Fällen sehr schlecht, in den beiden anderen setzte sich überhaupt keine Zelle ab. Bei einer Fermentkonzentration von 0,5% waren 62% der Zellen angefärbt, die Zellausbeute war gering. Bei 0,25% wurden keine Zellen sondern nur Detritus isoliert. Das Ferment ist nach diesen Ergebnissen für die Zellisolierung ungeeignet.

#### 2. Trypsin mit Zusätzen.

##### a. Pyosolva (Kalichemie)

Hier handelt es sich um einen Glycerinauszug aus Pankreas mit 70% Glycerin und 18 Willstätter-Einheiten Ferment pro ml. Das Präparat brachte in den ersten Untersuchungen auffallend gute Ergebnisse in 1,4volumenprozentiger Lösung. Es zeigte in 10 von 12 Fällen eine höhere Zellausbeute und eine geringere Zahl toter Zellen als die Vergleichslösung. Es soll zusammen mit dem folgenden weiter abgehandelt werden.

##### b. Trypsin Difco mit Glycerinzusatz

Die guten Erfahrungen mit Pyosolva legten den Gedanken nahe, daß der Glyceringehalt an dem Resultat beteiligt sein könnte. Es wurden daher in 5 Versuchen die Ergebnisse bei 1-, 2-, 5- und 10prozentigem Glycerinzusatz sowie mit dem üblichen 0,2%igen Trypsin miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß die Zellausbeute mit zunehmendem Glyceringehalt steigt. Die Zahl toter Zellen sinkt bis 2% Glycerinzusatz und steigt dann wieder an. Bei 10% setzen sich die Zellen entweder gar nicht ab, oder es ist ein sehr schlechtes Wachstum zu verzeichnen. Ein 2prozentiger Glycerinzusatz erwies sich damit als optimal für Trypsin Difco 0,2%. Mit dieser Konzentration wurde weiter gearbeitet.

Die folgende Tabelle vergleicht in 12 Versuchen 0,2% Trypsin Difco (TD), 0,2% Trypsin Difco mit 2% Glycerin (Gl) und 1,4vol.% Pyosolva (Py).

Tab. 11

| Versuch | Zellzahl $\times 10^3/\text{cm}^2$ |     |     | % gefärbte Zellen |    |    |
|---------|------------------------------------|-----|-----|-------------------|----|----|
|         | TD                                 | Gl  | Py  | TD                | Gl | Py |
| 1       | 225                                | 350 | 310 | 6                 | 5  | 3  |
| 2       | 220                                | 150 | 215 | 21                | 27 | 26 |
| 3       | 266                                | 230 | 210 | 14                | 12 | 10 |
| 4       | 270                                | 480 | 375 | 10                | 6  | 5  |
| 5       | 78                                 | 130 | 110 | 9                 | 4  | 7  |
| 6       | 187                                | 410 | 295 | 17                | 16 | 22 |
| 7       | 233                                | 416 | 390 | 16                | 10 | 13 |
| 8       | 150                                | 190 | 243 | 13                | 9  | 10 |
| 9       | 253                                | 363 | 322 | 17                | 14 | 11 |
| 10      | 165                                | 136 | 103 | 24                | 18 | 7  |
| 11      | 133                                | 158 | 488 | 15                | 6  | 13 |
| 12      | 288                                | 197 | 335 | 4                 | 6  | 3  |

Fig. 9 und 10 zu Tab. 11

Vergleich von : ————— Trypsin Difco 0,2%  
 - - - - - Trypsin Difco 0,2% + 2% Glycerin  
 —○—○— Pyosolva 1,4%

Fig. 9 Glycerinzusatz und Ausbeute

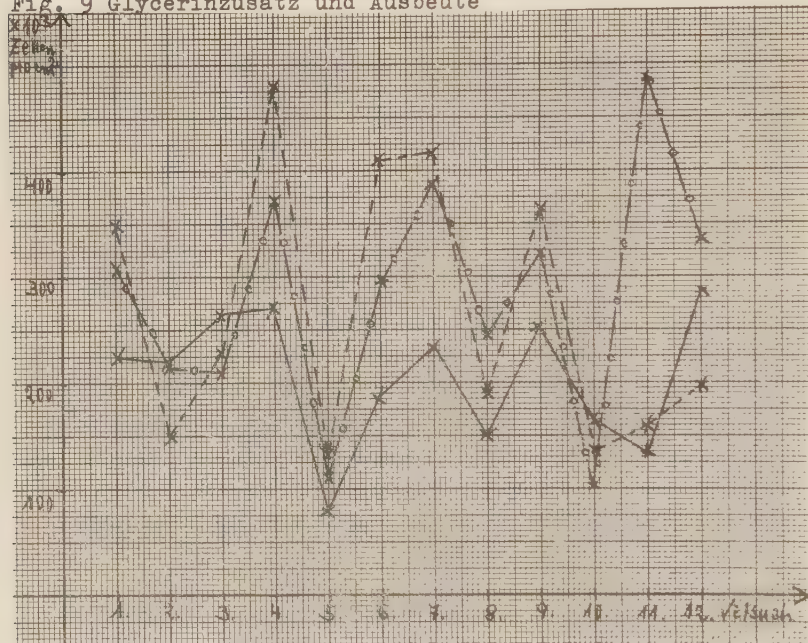
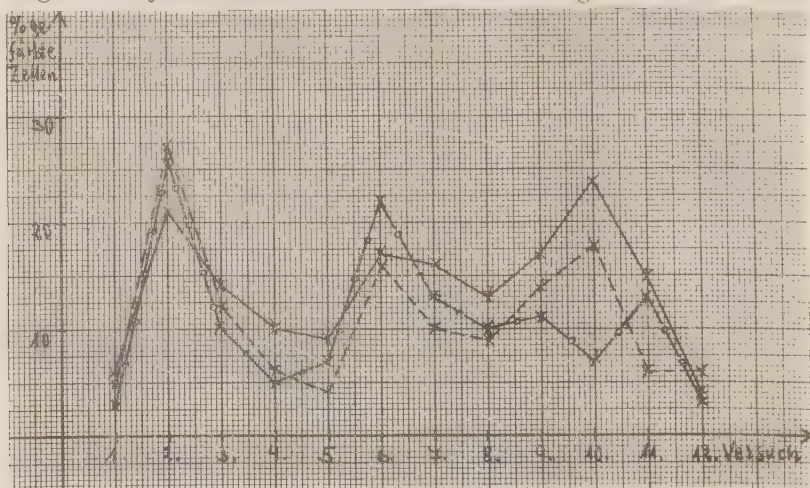


Fig. 10 Glycerinzusatz und Prozentsatz angefärbter Zellen



Aus dieser Versuchsreihe läßt sich schließen, daß der Glycerinzusatz eine deutliche Verbesserung der Trypsinwirkung mit sich bringt, sowohl nach Ausbeute als auch nach Güte der Zellen.

Nochmals zusammengestellt ist

Tab. 12

nach der Ausbeute

|                                                      |   |          |   |      |   |
|------------------------------------------------------|---|----------|---|------|---|
| Pyosolva besser als Trypsin Difco in 10/12 der Fälle |   |          |   |      |   |
| Tr.+Glyc."                                           | " | "        | " | 9/12 | " |
| Tr.+Glyc."                                           | " | Pyosolva | " | 8/12 | " |

" % gefärbter Zellen

|            |   |                 |       |   |   |
|------------|---|-----------------|-------|---|---|
| Pyosolva " | " | Trypsin Difco " | 10/12 | " | " |
| Tr.+Glyc." | " | "               | 10/12 | " | " |
| Pyosolva " | " | Trypsin+Glyc. " | 7/12  | " | " |

Weil die 1,4volumenprozentige Lösung von Pyosolva nur 1% Glycerin enthält, wurde ihr in den nächsten 5 Versuchen nochmals 1% Glycerin zugesetzt und die Wirksamkeit mit derjenigen von 0,2% Trypsin Difco mit 2% Glycerinzusatz verglichen.

Tab. 13

| Versuch | Zellzahl x $10^3/\text{cm}^2$ |     | % gefärbte Zellen |    | Wachstum |    |
|---------|-------------------------------|-----|-------------------|----|----------|----|
|         | Gl                            | Py  | Gl                | Py | Gl       | Py |
| 1       | 374                           | 334 | 12                | 18 | 2        | 2  |
| 2       | 334                           | 398 | 12                | 11 | 1        | 1  |
| 3       | 155                           | 140 | 8                 | 15 | 2        | 2+ |
| 4       | 217                           | 185 | 9                 | 7  | 1        | 1  |
| 5       | 260                           | 375 | 12                | 9  | 3        | 2  |

Tab. 13 zeigt, daß in dieser Zubereitung beide Fermente praktisch gleichwertig sind.

## c. Trypsin mit Kollidonzusatz

Um die Schutzwirkung hochpolymerer Verbindungen bei der Trypsinierung zu untersuchen, erhielt die 0,2%ige Trypsinlösung einen Zusatz von 0,5%, 0,25% und 0,1% Kollidon (K90). Aus Tab. 14 auf Seite 36 ergibt sich, daß Kollidon keinen Vorteil bietet. Die Ausbeute vergrößert sich nicht, und obwohl die isolierten Zellen oft ein gutes Aussehen haben und weniger gefärbte Zellen gezählt werden, so zeigen sie doch anschließend eine nur geringe Tendenz, sich abzusetzen und ein langsames Wachstum.

Tab. 14

| Vers. | Zellzahl $\times 10^3/\text{cm}^2$ |     |      |     | % gefärbte Zellen |     |      |     | Wachstum |     |      |          |  |
|-------|------------------------------------|-----|------|-----|-------------------|-----|------|-----|----------|-----|------|----------|--|
|       | 0                                  | 0,5 | 0,25 | 0,1 | 0                 | 0,5 | 0,25 | 0,1 | 0        | 0,5 | 0,25 | 0,1% K90 |  |
| 1     | 340                                | 338 | 322  | 190 | 8                 | 8   | 10   | 9   | 2        | 2   | 3    | 4        |  |
| 2     | 245                                | 286 | 366  | 347 | 20                | 13  | 11   | 21  | 3        | 2   | 2-   | 3        |  |
| 3     | 208                                | 200 | 151  | 175 | 15                | 9   | 11   | 7   | 2        | 2-  | 3    | 4        |  |
| 4     | 284                                | 241 | 263  | 252 | 6                 | 6   | 3    | 5   | 2        | 3   | 4    | 5        |  |
| 5     | 272                                | 267 | 292  | 330 | 6                 | 2   | 3    | 7   | 1        | 2   | 3    | 3-       |  |

## d. Trypsin und Hyaluronidase

Hyaluronidase der Firma Schuchard und der Firma Roth wurden in calcium- und magnesiumfreier Phosphatpufferlösung angesetzt. Das Ferment allein erwies sich am Amnion als wirkungslos. Daraufhin wurde untersucht, ob Hyaluronidasezusatz die Trypsinwirkung beeinflusst. Einer 0,1%igen Trypsinlösung wurden Mengen von 10-2000 Einheiten pro ml zugesetzt.

Tab. 15 S. 37

Tab. 15

| Vers. | Ferment                         | Zellz. $\times 10^3 / \text{cm}^2$ | %gefärbt | Wachst. |
|-------|---------------------------------|------------------------------------|----------|---------|
| 1     | 0,1%TD Ca-Mg-frei + 2000E.Hyal. | 151                                | 48       | 6       |
|       | " " " + 100" "                  | 223                                | 11       | 1       |
|       | " " " + 0" "                    | 326                                | 10       | 1       |
|       | 0,2%" Ca-Mg-haltig              | 165                                | 13       | 1       |
| 2     | 0,1%" Ca-Mg-frei + 1000" "      | 90                                 | 28       | 3-      |
|       | " " " + 100" "                  | 310                                | 10       | 2       |
|       | " " " + 0" "                    | 200                                | 4        | 2+      |
|       | 0,2%" Ca-Mg-haltig              | 340                                | 4        | 1       |
| 3     | 0,1%" Ca-Mg-frei + 800" "       | 100                                | 30       | 3       |
|       | " " " + 100" "                  | 350                                | 22       | 1       |
|       | " " " + 0" "                    | 395                                | 6        | 1       |
|       | 0,2%" Ca-Mg-haltig              | 525                                | 6        | 1       |
| 4     | 0,1%" Ca-Mg-frei + 200" "       | 406                                | 12       | 1       |
|       | " " " + 50" "                   | 510                                | 5        | 1       |
|       | " " " + 10" "                   | 474                                | 5        | 1       |
|       | " " " + 0" "                    | 480                                | 10       | 1       |

In Tab. 15 zeigt sich, daß Hyaluronidase in sehr hohen Dosen die Trypsinwirkung hemmt und die Zellen schädigt. Diese Erscheinung wurde von 200 E. abwärts nicht mehr beobachtet, doch ergab sich durch den Zusatz auch kein Vorteil. Die Ergebnisse waren im Gegenteil ohne Hyaluronidase im Durchschnitt etwas besser.

Eine Besonderheit zeigten die Kulturen außerdem: Während die Zellen im Überstand nach Isolierung mit anderen Fermenten häufig zu größeren Verbänden wieder verkleben, bei denen man im Mikroskop sieht, daß sie durch fadenförmige Strukturen zusammengehalten werden, finden sich nach Hyaluronidasezusatz fast nur Einzelzellen im Überstand. Offenbar wird die schleimig-fadenziehende Substanz durch die Hyaluronidase abgebaut.

### e. Trypsin und Versen

Der Calciumkomplexbildner Versen = EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), der zur Isolierung von HeLa-Zellen, in der Amnionsubkultur und zur Gewinnung embryonaler Hühnchenzellen verwendet wird (Dunnebacke und Zitcer 1957, Zwilling 1954), war allein zur Aufschließung des Amnion-epithels nicht geeignet. Es wurden 0,2, 0,1, 0,05 und 0,02 prozentige Lösungen angewendet. Zwar war das Aussehen der Zellen auf der Haut verändert, sie waren klar und sehr scharf konturiert, als ob es sich um lauter Einzelzellen handle, aber sie hafteten fest.

Nach der 1957 von Fogh und Lund angegebenen Methode zur Herstellung von Amnionsubkulturen wird die Primärkultur einige Minuten mit 0,02%iger Versenlösung vorbehandelt und anschließend trypsiniert, weil sich die Zellen mit Trypsin allein nur schwer oder überhaupt nicht lösen.

Um festzustellen, ob sich bei ähnlichem Vorgehen Vorteile bei der Herstellung der Amnionprimärkultur ergäben, wurde die Amnionhaut 20-30 Minuten in 0,02%iger Versenlösung inkubiert und dann in gewohnter Weise weiter trypsiniert. In 4 Versuchen unterschieden sich die Ergebnisse nicht von denjenigen, die der Vergleichsfall ohne Versenvorbehandlung aufwies.

Darum wurde die Mischung von Versen mit Trypsin versucht. Dazu wurden die Lösungen getrennt zubereitet, Versen in calcium- und magnesiumfreier Phosphatpufferlösung autoklaviert, Trypsin in ebensolcher Lösung mit Seitzfilter sterilisiert, und vor dem Gebrauch zusammengegeben.

Nach diesen Untersuchungen unterstützt Versen die Trypsinwirkung. Da Trypsin zu seiner Aktivierung Calciumionen benötigt, so scheint hier ein Widerspruch zu liegen. Doch darf man wohl annehmen, daß sich geringe aktivierende Elektrolytmengen immer noch im Gewebe vorfinden, während der durch den Chelatbildner bewirkte große Calciumverlust den Zusammenhalt der Zellen lockert und für das Trypsin leichter angreifbar macht.

Bei gleichzeitiger Anwendung kommt man mit sehr geringen Trypsinkonzentrationen aus. Man findet, daß die Zugabe von 0,02% Versen die Trypsinwirkung ungefähr verfünffacht, d. h., 0,04% Trypsin und 0,02% Versen in calcium- und magnesiumfreier Pufferlösung entsprechen etwa einer 0,2%igen Trypsinlösung in PBS. In dieser Konzentration kann man die dem Versen oft zugeschriebenen Zellschädigungen nicht feststellen (5 Versuche). Aber bereits bei Zusatz von 0,05% Trypsin treten sie auf und nehmen mit wachsender Fermentkonzentration rasch zu. Hierbei zeigen die Zellen in der Zählkammer ein gutes, gleichförmiges Aussehen und färben sich nur zu einem geringen Prozentsatz mit Trypanblau an. Doch haben sie eine große Tendenz, in vitro zu „Gerinnseln“ und langen Fäden zu verkleben, in denen sich dann ein guter Teil der gesamten Aussaat verfängt. Die Zellen, die sich aber absetzen, zeigen meist ein gutes Wachstum und bilden oft verspätet noch einen besonders schönen Zellrasen. Wahrscheinlich ist, daß die als Versenschädigung angesehenen Erscheinungen nicht durch die Substanz selbst bedingt sind sondern dadurch, daß das Trypsin relativ zu konzentriert zugesetzt wurde.

Abgesehen von der Ersparnis an Trypsin bringt der Versenzusatz aber keine Vorteile. Einzelzellen erhält man fast immer auch bei der üblichen Art der Trypsinierung, die Ausbeute vergrößert sich nicht, und das Wachstum ist weniger zuverlässig.

#### f. Trypsin in calcium- und magnesiumfreier Lösung

Auch ohne Versenzusatz verstärkt eine calcium- und magnesiumfreie Pufferlösung die Trypsinwirkung (Moscona 1952). In Tab. 16 S. 40 wird die Wirkung einer 0,15%igen Trypsinlösung in calcium- und magnesiumfreiem Phosphatpuffer (0,15% Ca-) mit der Wirkung der in üblicher Weise hergestellten 0,2%igen Trypsinlösung in calcium- und magnesiumhaltiger Pufferlösung (0,2% Ca+) verglichen.

Tab. 16

| Vers. | Zellzahl x 10 <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup> |         | % gefärbte Zellen |         | Wachstum |     |
|-------|---------------------------------------------|---------|-------------------|---------|----------|-----|
|       | 0,15%Ca-                                    | 0,2%Ca+ | 0,15%Ca-          | 0,2%Ca+ | Ca-      | Ca+ |
| 1     | 161                                         | 101     | 20                | 25      | 2        | 2   |
| 2     | 289                                         | 189     | 11                | 14      | 2        | 1   |
| 3     | 208                                         | 180     | 17                | 13      | 2        | 2+  |
| 4     | 386                                         | 333     | 7                 | 11      | 1        | 1   |
| 5     | 255                                         | 320     | 7                 | 15      | 2+       | 1   |
| 6     | 233                                         | 356     | 8                 | 7       | 2        | 1   |

Wie die Tabelle zeigt, entsprechen sich die beiden Lösungen ungefähr. Die etwas höhere Zellausbeute bei calciumfreier Lösung wird durch das bessere Wachstum nach Isolierung in PBS ausgeglichen. Das Wachstum der in calciumfreiem Phosphatpuffer gewonnenen Zellen ist meist nicht so gut, wie die niedrige Zahl trypanblau gefärbter Zellen erwarten läßt. Wachstumsunterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen sprachen immer zugunsten der mit calciumhaltiger Lösung isolierten Zellen, doch waren die Unterschiede nie sehr groß und alle Kulturen brauchbar.

Bemerkenswert ist noch, daß Trypsin in calciumfreier Lösung deutlich weniger haltbar ist als in PBS. Hebt man das Ferment einige Wochen bei + 4° im Kühlschrank auf, so nimmt seine zellisolierende Kraft viel rascher ab, als das bei dem in calciumhaltigem Puffer angesetzten Trypsin der Fall ist.

#### g. Trypsin in calcium-, magnesium- und phosphatfreier Pufferlösung

Puck gab 1957 eine Pufferlösung an, in der außer Calcium und Magnesium auch die Phosphate fehlen. In den folgenden Versuchen, Tab. 17 S. 41, sollte festgestellt werden, ob in dieser Lösung die proteolytische Wirkung des Trypsins weiter zunimmt. Dazu wurden 5 Amnionhäute je zur Hälfte in einer Lösung von 0,15% Trypsin in calcium- und magnesiumfreiem Phosphatpuffer und von 0,15% Trypsin in Pucks Lösung inkubiert.

Ph+ : 0,15% Trypsin in Ca- und Mg-freier Phosphatpufferlösung  
 Ph- : " " " Pucks Lösung

Tab. 17

| Versuch | Zellzahl x 10 <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup> |     | % gefärbte Zellen |     | Wachstum |     |
|---------|---------------------------------------------|-----|-------------------|-----|----------|-----|
|         | Ph+                                         | Ph- | Ph+               | Ph- | Ph+      | Ph- |
| 1       | 165                                         | 82  | 20                | 14  | 3        | 4   |
| 2       | 386                                         | 290 | 7                 | 10  | 1        | 1   |
| 3       | 255                                         | 193 | 7                 | 17  | 2+       | 2   |
| 4       | 328                                         | 260 | 9                 | 17  | 2        | 2+  |
| 5       | 227                                         | 183 | 10                | 11  | 3        | 3   |

Aus der Tabelle ergibt sich, daß mit zusätzlichem Wegfall der Phosphate die zellisolierende Kraft des Trypsins wieder abnimmt. Auch das Wachstum wird wieder etwas schlechter, vorwiegend deshalb, weil man zahlreiche Zellkomplexe und wenig Einzelzellen erhält und damit einen unregelmäßigen Zellrasen.

### 3. Papain

Papain ist eine Protease pflanzlichen Ursprungs und wird aus dem Saft von *Carica papaya*, dem Melonenbaum gewonnen. In die gleiche Gruppe gehören außerdem Ficin aus Feige und Bromelin aus Ananas.

Die Untersuchungen wurden mit Papain Merck 1:350 und Papain Difco durchgeführt. Die Fermente wurden in PBS gelöst und mit 0,2g Cysteinhydrochlorid pro Liter aktiviert (Willstätter 1928, Kimmel und Smith 1954).

Die zuvor genannten Autoren geben für Papain einen Wirkungsbereich von pH 5-7 an.

In einer Reihe von orientierenden Vorversuchen wurde Papain zur Isolierung der HeLa-Stammzelle verwendet. Hier fand sich, daß die Zeit bis zur vollständigen Ablösung des Zellrasens bei pH 7,3 - 7,6 am kürzesten war. Ebenso wie bei der Trypsinwirkung gegenüber dem Amnionepithel lag auch hier, das pH-Optimum bei 7,3 - 7,6 und unterschied sich deutlich von den gegenüber Casein und Gelatine gefundenen Werten.

Die HeLa-Zellen wurden in 5 aufeinanderfolgenden Passagen mit Papain behandelt, und es zeigten sich folgende morphologische Unterschiede: Während die mit Trypsin isolierten Zellen einen dünnen, hellen Zellrasen bilden, ist der Rasen papainisolierter Zellen makroskopisch dick und grau. Mikroskopisch zeigen die mit Papain behandelten Zellen schärfere Konturen, stärkere Granulierung, ein polymorphes Zellbild, sowie einen loseren Verband und häufig Lücken im Zellrasen, die sich auch nach Tagen nicht schließen, gegenüber dem gleichförmigen, klaren Epithel der mit Trypsin umgesetzten HeLa-Zelle, bei der die Zellgrenzen manchmal nur schwer zu erkennen sind. Bei der Beimpfung mit Poliovirus in der 5. Passage zeigte sich allerdings kein Unterschied in der Empfindlichkeit verglichen mit trypsinisierten Zellen. Zellen, die bereits ein- oder mehrmals mit Papain umgesetzt wurden, lösen sich bei erneuter Behandlung sehr viel schneller als Zellen, die immer mit Trypsin isoliert wurden.

Nach diesen Beobachtungen erwies sich das Ferment zur Umsetzung von HeLa-Zellen brauchbar, aber wesentlich schlechter verträglich als Trypsin. In 2%iger Lösung wirkte es ausgesprochen toxisch.

Um es besser verträglich zu machen, wurde nun versucht, das Papain nach der Methode von Kimmel und Smith(1954) zu reinigen und anzureichern. Verglichen mit dem Ausgangswert konnte doppelte Aktivität erreicht werden. Eine qualitative Verbesserung der Wirkung auf die Zellen war nicht festzustellen. Der Versuch wurde abgebrochen.

Am Amnion wurde Papain in Konzentrationen von 0,25% - 2% verwendet und unter pH-Werten von 6,4 - 8, mit und ohne Aktivierung durch Cystein, vor und nach der Sterilisation durch Seitzfilter. Alle Versuche ergaben das gleiche Bild: Die Zellen lösten sich nicht, sondern saßen stark granuliert und deformiert auf der Haut. Bei sehr starkem Schütteln löste sich an manchen Stellen das Epithel in großen Flächen.

Auch die Amnionsubkultur sprach auf Papain allein nicht an. Nach 30minütiger Versenvorbehandlung lösten sich mit Papain etwa  $1/3$  der Zellen und konnten erneut ausgesät werden. Der Rest haftete fest am Glas.

Dagegen ließ sich die FL-Stammzelle ohne Schwierigkeiten mit Papain isolieren und zeigte nach der Wiederaussaat gutes Wachstum.

Während die Nieren erwachsener Meerschweinchen mit Trypsin eine hohe Ausbeute vitaler Einzelzellen und kleiner Zellkomplexe liefern, konnten sie mit Papain nicht aufgeschlossen werden.

Hoang, Rohde und Kotschate beschreiben 1959 die gute Eigenschaft von Papain für die Herstellung von Primärkulturen aus Hühnerembryo und embryonaler Rinderniere bei einem pH-Wert von 7. Der Versuch mit Hühnerembryonen wurde mehrmals wiederholt und die gute Brauchbarkeit des Fermentes konnte bestätigt werden. Eine solche Kultur wurde in 14 Wochen achtmal mit Papain umgesetzt.

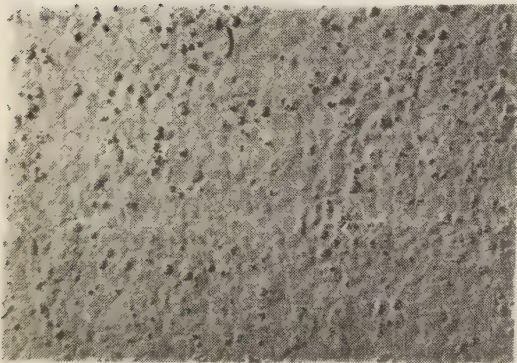


Abb. 4

Primärkultur trypsinisolierter Nierenzellen vom erwachsenen Meerschweinchen 6 Tage nach der Aussaat.

Vergr. 1:

## D i s k u s s i o n

Seit einigen Jahren wird die Amnionepithelzelle häufig zum Nachweis menschenpathogener Virusarten in der Gewebekultur verwendet. Die Zelle ist relativ leicht zu gewinnen, jedoch kann sie bereits vor Beginn der eigentlichen Isolierung mit proteolytischen Fermenten schwer und irreversibel geschädigt werden.

Dunnebacke und Zitcer (1957) beschreiben eine Reihe von Fehlschlägen bei der Herstellung von Amnionprimärkulturen, weil die Eihäute bei der Geburt mit Desinfektionsmitteln in Berührung gekommen wären.

Weitere Schädigungsmöglichkeiten sind durch die Art der Aufbewahrung gegeben, wenn das Amnion nicht sofort nach der Geburt weiterverarbeitet werden kann. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben: Die meisten Autoren lösen für eine längere Aufbewahrung die Häute von der Placenta ab und legen sie bei Zimmertemperatur in Phosphatpufferlösung (Dunnebacke und Zitcer 1957, Takemoto und Lerner 1957, Mandin und Pourquier 1958). Für kürzere Zeiten, maximal 8-9 Stunden, wird die Placenta auch in toto bei 22° C aufgehoben (Lahelle 1956, Weinstein, Alexander, Yoshihara und Kirby 1956, Dunnebacke und Zitcer 1957). Lehmann-Grube (1961) fand selbst nach 24 Stunden Aufbewahrung bei Zimmertemperatur noch eine gute Zellausbeute, sofern das Amnion der Placenta fest aufgesessen hatte. Mandin und Pourquier warnen vor Kühlschranktemperaturen, weil diese das Amnion in kürzester Zeit unbrauchbar machten. Dagegen war aus eigenen Beobachtungen bekannt, daß sich Nierengewebe und Suspensionen der verschiedensten Zellen sehr gut bis zu mehreren Tagen im Kühlschrank aufbewahren lassen.

Alle Autoren stimmen darin überein, daß es am günstigsten ist, das Amnion sofort nach der Geburt zu verarbeiten, jedoch wurden die Resultate bei verschiedenen Formen der Aufbewahrung bisher nirgends miteinander verglichen.

Die vorliegende Arbeit bringt in systematischer Gegenüberstellung die Ergebnisse nach Aufbewahrung der ganzen Placenta und des abgelösten Amnions jeweils bei Zimmertemperatur und bei 4° C bis zu 48 Stunden. Es stellt sich heraus, daß es am günstigsten ist, die ganze Placenta bei Zimmertemperatur in PBS aufzuheben und daß man bei diesem Vorgehen selbst nach 48 Stunden noch brauchbare Zellen isolieren kann. Weniger gut, aber noch zufriedenstellend sind die Ergebnisse, wenn man das Amnion abgelöst bei Zimmertemperatur aufhebt. Wenn das Amnion der Placenta fest aufsitzt, kann man auch nach 48 Stunden Aufbewahrung im Kühlschrank noch eine befriedigende Zellausbeute und ein gutes Wachstum bekommen, im Gegensatz zu den Feststellungen von Mandin und Pourquier (1957); jedoch sind, in Übereinstimmung mit deren Beobachtung, beim abgelösten Amnion schon nach kurzdauerndem Kühlschrankaufenthalt keine vitalen Zellen mehr zu erwarten. Wie die Schädigung hier zustandekommt, ist unklar, zumal sich die Suspension der mit Trypsin isolierten Amnionepithelzellen wiederum gut im Kühlschrank hält und selbst nach 96 Stunden noch ausgesät werden kann.

Eine ebenfalls von der Methode der Zellisolierung unabhängige Grundvoraussetzung für das Gelingen der Gewebekultur sind einwandfrei gewaschene Kulturgefäße, wie Shu (1962) zeigen konnte. Amnionzellen sind in dieser Hinsicht anspruchsvoller und empfindlicher als etwa HeLa-Zellen.

Bei unveränderter Arbeitsmethode und schonendem Vorgehen wechseln doch Ausbeute und Güte der Zellen von einer Eihaut zur anderen recht erheblich. Die Zellzahl wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Flächeninhalt bezogen, der durch Ausbreiten der Haut zwischen zwei Plastikfolien ermittelt wurde; denn das z. B. von Lahelle (1956) herangezogene Gewicht liefert wegen der verschiedenen Dicke und des unterschiedlichen Wassergehaltes der Eihäute einen unsicheren Vergleichswert.

Nach eigenen Beobachtungen erhält man die besten Ergebnisse, wenn das Amnion bis zur Trypsinierung dem Chorion fest aufsitzt und ein gleichmäßig dickes, weißliches Epithel zeigt. Durchschnittlich ergaben sich 200-400000 Zellen pro  $\text{cm}^2$ , was einer Ausbeute von  $350-400 \times 10^6$  Zellen pro Amnion entspricht. Es gelingt selten, alle Zellen zu entfernen. In einem solchen Fall darf man mit  $600 \times 10^6$  Zellen pro Amnion rechnen. Bei einer Aussaat von ca. 350 000 Zellen pro ml war der Zellrasen meist nach 3 - 5 Tagen geschlossen.

Beim Arbeiten mit mehreren Stücken des gleichen Amnions ergaben sich oft auffallend verschiedene Resultate. Daraufhin wurde untersucht, ob sich regelmäßige Unterschiede zwischen den Epithelien der einzelnen Partien einer Haut feststellen lassen. Die Versuche zeigten, daß der wertvollste Bezirk des Amnions, sowohl was Vitalität der Zellen, als auch, was Ausbeute betrifft, die zentrale, der Placenta aufsitzende Partie ist. Mikroskopisch zeigen diese Stellen ein mehrschichtiges Epithel, während das Epithel der Peripherie flach und einschichtig ist. (Petry und Damminger 1956).

Auch die Morphologie der Zellen wechselt von Fall zu Fall. Im allgemeinen lassen runde Zellen mit klarem Protoplasma die besten Ergebnisse erwarten, doch erhält man von den zentralen Partien häufig auch zylindrische Zellen mit guter Wachstumstendenz, die sich in der Folge meist noch etwas abkugeln. Starke Größenunterschiede, Polymorphie und geschwänzte Zellen zeigen schon bei der Trypanblaufärbung, daß das Amnion schlecht oder unbrauchbar ist. Besonders sehr kleine runde Zellen, kaum größer als Erythrozyten, kommen in größeren Mengen nur bei ungeeigneten Amnionhäuten vor.

Vakuolig aufgetriebene Zellen mit randständigem, plattem Kern finden sich in wechselnder Häufigkeit auf dem Amnion, fallen aber oft erst in der Subkultur in größerer Anzahl auf. Nach Petry und Damminger (1956) und nach Bautzmann und Schröder (1955) könnte es sich dabei um besondere Funktionszustände

der Epithelzellen handeln, die in vivo mit der Produktion des Fruchtwassers zu tun haben. Mehrere solcher Vakuolen können zu Riesenvakuolen, "Kolossalzellen", zusammenfließen (Bautzmann und Schröder (1955)).

Beim Arbeiten mit proteolytischen Fermenten in der Gewebekultur werden immer wieder irreversible Zellschädigungen beschrieben (Phillips und Terryberry 1957, Gifford, Robertson und Syverton 1957), die dann ausschließlich auf das Ferment selbst zurückgeführt werden. Auch bei den eigenen Versuchen wurden bei Trypsinierung unter verschiedenen Bedingungen deutliche bis schwerste Schäden beobachtet. Andererseits konnte gezeigt werden, daß solche Erscheinungen auch bei langdauernden Trypsinierungszeiten nicht auftreten müssen, obwohl der proteolytische, d. h. zellisolierende Effekt voll vorhanden ist.

Bereits 1910 befaßt sich Ferri mit ähnlichen Beobachtungen und stellt fest, daß das lebende Protoplasma von proteolytischen Fermenten allein nicht angegriffen wird, daß diese Resistenz in der Natur der lebenden Zelle liege und keiner besonderen Schutz- und Abwehreinrichtungen bedürfe.

Monné trifft 1946 die gleiche Feststellung. Er ist der Meinung, daß "die Eiweiße der Zelle durch Lipide vor den erwähnten Enzymen geschützt sind". Bei Reizung oder Schädigung der Zelle wird dieser Schutz durchbrochen und die Eiweiße für die Fermente zugänglich.

Northrop (1947) hält Kaulquappen und Arbacia-Eier in 0,1-1%igen Lösungen von Papain, Ficin und Trypsin. Die Tiere blieben 12-14 Stunden lebend und aktiv, während zuvor abgetötete Tiere unter Abnahme der Fermentaktivität der Lösung teilweise verdaut wurden. Die Eier entwickelten sich in Trypsin und Ficin zu Larven. Dagegen wurde in Papain die ektoplasmatistische Lage, die die Zellen in den ersten Teilungsstadien zusammenhält und für die Formgebung des Organismus notwendig ist, abgebaut, so daß sich keine Larve entwickelte.

Jedoch waren Vitalität und Teilungsfähigkeit der Einzelzelle unbeeinflusst.

Andere Autoren betonen, daß Trypsineinwirkung lebende Zellen nicht nur nicht schädigt, sondern das Wachstum sogar fördert. Simms und Stillman (1937) fanden, daß mit Trypsin vorbehandelte Gewebestückchen von Hühneraorta 20% ihres Stickstoffgehaltes eingebüßt haben, aber in der Gewebekultur ein deutlich früher und stärker einsetzendes Wachstum, eine Verkürzung der "lag period", aufweisen als unbehandeltes Gewebe.

Ebenso berichtet L. Weiss 1958, daß die Trockenmasse von Sarcoma 37-Zellen nach Trypsineinwirkung um 20% abgenommen hat, während Zelldurchmesser und Vitalität unbeeinflusst blieben.

Auch Magee, Sheek und Sagik (1958) stellten fest, daß zwar für die chemische Analyse mechanisch vom Glas gelöste Gewebekulturzellen geeigneter sind, zur erneuten Aussaat aber solche, die mit Trypsin isoliert wurden.

Man darf also annehmen, daß die proteolytische Wirkung des Trypsins in den zur Zellisolierung notwendigen Konzentrationen keine Zellschädigung verursacht. Das ändert sich jedoch, wenn die Zelle durch eine zusätzliche Noxe angegriffen wird. Solche Noxen sind z. B. mechanischer Art bei scharfem Pipettieren, Rühren, Schütteln und Zentrifugieren in der Fermentlösung (Rappaport 1956). Auf Vermeidung dieser Schädigungsmöglichkeiten beruhen die guten Ergebnisse der hier referierten, von May und Shu (1964) ausgearbeiteten Methode zur Trypsinsinierung des Amnions.

Als zweite Noxe kommen nach den hier beschriebenen Beobachtungen beim Amnion niedrige Temperaturen in Betracht, wobei der Mechanismus der Schädigung unklar ist. Der Versuch, Amnionzellen bei 4° C mit Trypsin zu isolieren, brachte zum größten Teil tote Zellen. Das war zu erwarten, da sich die abgelöste Haut auch ohne Ferment nur schlecht bei niedrigen Temperaturen halten läßt.

Am schwierigsten sind chemische Schädigungen in Form von toxischen Beimengungen zum Ferment zu erfassen und auszuschalten.

Schäden, die bei langen Trypsinierungszeiten beobachtet wurden, dürften auf den oben beschriebenen zusätzlichen Noxen beruhen, meist wohl auf toxischen Beimengungen zum Ferment, ebenso die von Lahelle (1956) beschriebenen schlechten Ergebnisse bei Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ , die ihn veranlaßten, bei  $30^{\circ}\text{C}$  zu arbeiten. In den hier beschriebenen Versuchen vertrug das Amnion 6 - 8stündige Trypsinierung bei  $37^{\circ}\text{C}$  ohne weiteres. Längere Inkubationszeiten empfehlen sich bei der beschriebenen Methode schon deshalb nicht, weil sich die Zellen sonst vorzeitig ablösen und in der Fermentlösung verlorengehen.

Bei den Untersuchungen zum pH-Optimum des Trypsins für die Zellisolierung fand sich, daß dieser Wert bei pH 7,6 liegt, im Unterschied zu dem für Casein geltenden Wert, der mit 7,8 - 8,7 angegeben wird. Die Zellausbeute zeigte zwischen pH 7,2 und 7,4 einen steilen Anstieg, dem nach der alkalischen Seite hin ein allmählicher Abfall folgte.

Da der abdichtende und die Interzellulärsubstanz stabilisierende Effekt des Calciums bekannt ist, überrascht es nicht sehr, daß bei Entfernung des Calciums - etwa mit dem Calciumkomplexbildner Versen - das Gewebe leichter aufzuschließen ist. Lebergewebe läßt sich durch Perfusion der Leber mit Citrat oder Versen so weit aufschließen, daß zur Gewinnung von Einzelzellen nur noch leichtes Rühren nötig ist, keine weitere Fermenteinwirkung (Anderson 1953). Im Gegensatz dazu, wird nach den eigenen Beobachtungen das Amnionepithel von calciumfreier Lösung zwar auch angegriffen, doch ist zur Ablösung der Zellen Trypsin notwendig. Der Entzug des Calciums setzt aber die erforderliche Fermentkonzentration erheblich herab. Andererseits sind die Zellen, die in calciumfreier Lösung gewonnen wurden, weniger stabil und leichter zu schädigen.

Die in calciumfreiem Phosphatpuffer angesetzte Trypsinlösung nimmt in ihrer zellisolierenden Kraft deutlich rascher ab als die gleiche Fermentkonzentration in calciumhaltiger Phosphatpufferlösung, wie wir schon nach 3 - 4 Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank feststellen konnten.

Fehlen außer Calcium und Magnesium auch noch die Phosphate in der Fermentlösung, so wird bei sonst gleichem Trypsingehalt die proteolytische Kraft der Lösung wieder geringer.

Bei Arbeiten mit Pyosolva, einem Glycerinauszug aus Pankreas, konnte eine wesentliche Verbesserung der Trypsinwirkung beobachtet werden. Die Zellausbeute stieg an, der Prozentsatz toter Zellen nahm ab und das Wachstum wurde deutlich besser. Der gleiche Effekt war durch einen Glycerinzusatz zu der üblichen Trypsinlösung zu erreichen. Worauf diese günstige Wirkung des Glycerins beruht, ist unklar.

Mit der hochpolymeren Substanz Kollidon, die sich in der Rotationskultur bewährt hat (G. May, 1964), war bei der Zellisolierung kein Schutzeffekt und keine Verbesserung der Ergebnisse zu erzielen.

Hyaluronidase wurde weder allein, noch zur Unterstützung der Trypsinwirkung am Amnion brauchbar gefunden. In sehr hohen Konzentrationen scheint sie die Zellen zu schädigen. Auch Moscona (1952) beobachtete bei Arbeit mit frühembryonalem Hühnchen, daß Hyaluronidase in zellisolierenden Konzentrationen zu einem hohen Prozentsatz abnormer Zellen führt.

Papain ist nicht in der Lage, die Interzellulärsubstanz von Epithelien anzugreifen. Amnionepithel löst sich bei sehr langer Inkubation und starkem Schütteln in große Flächen vom Untergrund, ohne in Einzelzellen zu zerfallen. Bei der Meerschweincheniere werden Glomerula und Tubuli in toto

isoliert, Einzelzellen oder kleinere Zellkomplexe waren auch hier nicht zu gewinnen. Rinaldini (1958) machte ähnliche Beobachtungen beim Arbeiten mit Epidermis. Dagegen ließen sich Hühnerfibroblasten in einer Reihe eigener Versuche gut mit Papain isolieren.

## Z u s a m m e n f a s s u n g

In Versuchen mit 115 Amnionhäuten werden die einzelnen Bedingungen bei der Herstellung von Primärkulturen untersucht.

Zunächst wird eine von May und Shu <sup>(1964)</sup> ausgearbeitete Methode beschrieben, die eine wesentliche Vereinfachung und Verbesserung bei der Gewinnung der Amnionepithelzellen darstellt.

Weiter werden die Unterschiede der Zellausbeute und -güte zwischen verschiedenen Amnionhäuten und zwischen verschiedenen Stellen des gleichen Amnions untersucht, wobei sich eine große Schwankungsbreite herausstellt und sich ergibt, daß die der Placenta direkt aufsitzende Partie des Amnions besonders wertvoll ist.

Der optimale pH-Wert bei der Trypsinierung von Amnionzellen liegt bei pH 7,6, während das pH-Optimum gegenüber Casein zwischen pH 7,8 und 8,7 angegeben wird.

Die Trypsinierungszeit kann bei einem Ferment, das nicht toxisch auf die Zellen wirkt, sehr lang gewählt werden und bringt so lange einen Anstieg der Zellausbeute, bis das Epithel so weit verdaut ist, daß die Zellen sich bereits im Ferment ablösen, was nach 4-5 Stunden der Fall ist.

Trypsinierungszeiten von 6-8 Stunden werden ohne stärkere Schädigung von den Zellen vertragen.

Die günstigste Konzentration für Trypsin Difco 1:250 liegt nach den beschriebenen Versuchen zwischen 0,2 und 0,4%.

Die optimale Temperatur während der Trypsinierung beträgt 37° C. Bei Zimmertemperatur ist die Zellisolierung ebenfalls möglich, dauert aber viel länger. Kühlschranktemperaturen führen beim Trypsinieren zu schwersten Zellschädigungen.

Kann das Amnion nach der Geburt nicht sofort verarbeitet werden, so wird es am besten mit der ganzen Placenta in PBS bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Von der Placenta abgelöst und bei 4° C aufgehoben ist es sehr rasch unbrauchbar.

Bei Berücksichtigung der hier festgestellten optimalen Bedingungen liegt die durchschnittliche Zellausbeute pro Amnion bei  $350-400 \times 10^6$  Zellen. Maximal wurden  $600 \times 10^6$  Zellen erreicht.

Der Anteil toter Zellen beträgt durchschnittlich 10%, doch darf man bei einem brauchbaren Amnion Werte um 5% erwarten. Bei Aussaat von 350 000 Zellen pro ml ist der Zellrasen nach 3-5 Tagen geschlossen.

Weiter wurden verschiedene Trypsinzubereitungen und andere Fermente auf ihre Brauchbarkeit untersucht.

Kristallisiertes Trypsin (Böhringer), war in seiner Wirkung auf das Amnion etwa viermal so stark wie Trypsin Difco. Trypsin Merck ist etwa sechsmal schwächer als Trypsin Difco, setzt eher Zellschäden, ist aber noch als brauchbar zu bezeichnen.

Pankreatin Merck ist zu toxisch und für die Amnionzellkultur ungeeignet.

Eine deutliche Verbesserung der Trypsinierung bringt der Zusatz von 2 % Glycerin.

Die Versuche mit der Trypsinzubereitung Pyosolva (Kalichemie), einem Glycerinauszug aus Pankreas, ergaben sehr gute Resultate.

Mit Kollidonzusatz konnte keine Verbesserung der Trypsinwirkung erzielt werden.

Hyaluronidase erwies sich sowohl allein als auch in Verbindung mit Trypsin zur Zellisolierung ungeeignet.

Durch den Entzug der Calciumionen läßt sich das Gewebe leichter für das Trypsin angreifbar machen.

Der Calciumkomplexbildner Versen führte allein nicht zur Zellisolierung, jedoch senkt er die erforderliche Trypsinkonzentration auf etwa  $1/5$ , wenn er der Fermentlösung zugesetzt wird. Auch bei calciumfrei angesetzten Trypsinlösungen ist die zellisolierende Wirksamkeit erhöht.

Dagegen verschlechtert der zusätzliche Wegfall der Phosphate die Trypsinwirkung wieder.

Papain ist zur Zellisolierung aus Epithelien ungeeignet. Sowohl Amnion wie Niere werden nicht aufgeschlossen, wohl aber embryonales Hühnergewebe.

## Literaturverzeichnis

1. St. Amand, G.S. und Tipton, S.R.: The separation of neuroblasts and other cells from grasshopper embryos.  
Science 119, 93, 1954
2. Anderson, N.G.: The mass isolation of whole cells from rat liver.  
Science 117, 627, 1953<sup>I</sup>
3. Bagdy, D. und Banga, I.B.: Extraction and purification of elastase from dried pancreas.  
Acta Physiol. Acad. Scient. Hung. 10/11, 371, 1957
4. Baló, J. und Banga, I.B.: Zerstörung der elastischen Fasern der Gefäßwand.  
Schwz. Zschr. Allg. Path. Bakt. 12, 350, 1949
5. Baló, J. und Banga, I.B.: The elastolytic activity of pancreatic extracts.  
Bioch. J. 46, 384, 1950
6. Bautzmann, H. und Schröder, R.: Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions.  
Zschr. Anat. Entwicklsgesch. 119, 7, 1955/56
7. Bodian, D.: Simplified method of dispersion of monkey kidney cells with trypsin.  
Virol. 2, 575, 1956
8. Daniel, Ph. und Depoux, R.: La dispersion des cellules par trypsination à basse température.  
Ann. Inst. Pasteur 92, 703, 1957
9. Dulbecco, R.: Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 747, 1952
10. Dulbecco, R. und Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with polio-virus.  
J. Exp. Med. 99, 167, 1954
11. Dunnebacke, T.H.: Cytopathogenic changes associated with poliomyelitis infections in human amnion cells.  
Virol. 2, 811, 1956

12. Dunnebacke, T.H. und Zitcer, E.M.: Preparation and cultivation of primary human amnion cells.  
Cancer Research 17, 1043, 1957
13. Ferri, C.: Sur les moyens de défense de l'estomac, de l'intestin, du pancreas et en général de la cellule et de l'albumine vivante vers les enzymes protéolytiques.  
Zbl.Bakt.I.Orig. 56, 55, 1910
14. Fogh, J. und Lund, R.: Plaque formation of poliomyelitis viruses on human amnion cell cultures.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 90, 80, 1955
15. Fogh, J. und Lund, R.: Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 94, 532, 1957
16. Földi, M., Toth, M. und Borsy, J.: Die Isolierung der Zellen mit Elastase bei der Gewebezüchtung.  
Zbl.Bakt.I Orig 177, 542, 1960
17. Gifford, G.E., Robertson, H.E. und Syverton, J.T.: Metabolism of HeLa Cells: Methodology and media evaluation.  
J.Cell.Comp.Physiol. 49, 367, 1957
18. Haff, R.F. und Swin, H.E.: Serial propagation of 3 strains of rabbit fibroblasts. Their susceptibility to infection with vaccinia virus.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 93, 200, 1956
19. Huxz, R.W. und Syverton, J.T.: Human amnion cell culture for study of influenza virus. Preparation of monolayer cultures with collagenase.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 101, 19, 1959
20. Huang, L.W., Ronde, W. und Kotschate: Use of papain for the preparation of monolayer tissue cultures.  
Acta Virol., English Edition, 3, 56, 1959
21. Katsuta, H., Takaoka, T. und Saito, S.: Cultivation of liver cells from the chick embryo in the simplified replicate tissue culture.  
Jap.J.Exp.Med. 27, 367, 1957

- 22.Kimmel,J.R. und Smith,E.L.: Crystalline Papain.  
I.Preparation,specificity, and activation.  
J.Biol.Chem. 207, 515, 1954
- 23.Lahelle,O.: Preparation of monolayer tissue cultures  
from human amniotic membranes.  
Acta Path.Microbiol.Scand. 39, 338, 1956
- 24.Lasfargues,E.Y.: Cultivation and behavior in vitro of  
the normal mammary epithelium of the adult  
mouse.  
Anat.Record 127, 117, 1957
- 25.Lehmann-Grube,F.: Preparation of cell cultures from  
human amniotic membranes.  
Archiv f.d.ges.Virusforschung XI, 258, 1961
- 26.Lennartz,H. und Kersting,G.: Die Gewebezüchtung mensch-  
lichen Amnionepithels und seine Verwendung in  
virologischen Untersuchungen.  
Zbl.Bakt.I Orig. 172, 45, 1958
- 27.Magee,W.E., Sheek,M.R. und Sagik, B.P.: Methods of har-  
vesting mammalian cells grown in tissue culture.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 99, 390, 1958
- 28.Mandin,J. und Pourquier,M.: Cultures des cellules amni-  
otiques et choriotiques humaines.  
C.R.Soc.Biol. (Paris) 151, 2169, 1957
- 29.May,G.:Zur Verwendung von Caseinhydrolysat als Nähr-  
medium für Gewebekulturen.  
Zbl.Bakt. I Orig. 175, 481, 1959
- 30.May,G.und Shu,H.: Zur Technik der Amnion-Trypsinierung.  
Zbl.Bakt. I Orig. 192, 295-99, 1964
- 31.May,G.: Die Kultivierung von Säugetierzellen in  
Suspensionskultur.  
Zbl.Bakt. I Orig. 193, 306-18, 1964
- 32.Milzer,A.,Levinson,S.,Vanderboom,K. und Adelman,Ph.:  
Cultivation of poliomyelitis virus ( Lansing  
strain) in human embryonic and placental tissues.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 74, 136, 1950

33. Monné, L.: Struktur- und Funktionszusammenhang des Zytoplasmas.  
Experientia 2, 153, 1946
34. Mookerjee, S.: Experimental dissociation of cells from chick embryos.  
Nature 171, 796, 1953
35. Moscona, A.: Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos.  
Exp. Cell Res. 3, 535, 1952
36. Moscona, A. und Moscona, H.J.: The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo.  
J. Anat. 86, 287, 1952
37. Northrop, J.N.: Action of papain and ficin on tadpoles and Arbacia eggs.  
J. Gen. Physiol. 30, 375, 1947
38. Pappenheimer, A.M.: Experimental studies upon lymphocytes.  
J. Exp. Med. 25, 633, 1917
39. Petry, G. und Damninger, K.: Untersuchungen über den Bau des menschlichen Amnions.  
Zschr. Zellforsch. 44, 229, 1956
40. Petry, G. und Zuleger, S.: Vergleichende Studie über den Bau der Eihüllen der Ratte.  
Zschr. Zellforsch. 47, 683, 1958
41. Phillips, H.J. und Terryberry, J.E.: Counting actively metabolizing tissue cultured cells.  
Exp. Cell Res. 13, 341, 1957
42. Puck, T.T., Cieciura, S.J. und Fisher, H.W.: Clonal growth in vitro of human cells with fibroblastic morphology.  
J. Exp. Med. 106, 145, 1957
43. Rinaldini, L.M.J.: The isolation of living cells from animal tissues.  
Intern. Rev. Cytol. 7, 587-647, 1958

44. Rinaldini, L.M.J.: An improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells.  
Exp. Cell Res. 16, 477, 1959
45. Rous, P. und Jones, F.S.: A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues and for the plating out of individual cells.  
J. Exp. Med. 23, 549, 1916
46. Shannon, Wilton und Waltz: Massive tissue cultures prepared from whole chick embryos planted as a cell suspension on glass substrate.  
J. Nat. Cancer Inst. 13, 349, 1952
47. Shu, H.: Morphologische und biologische Eigenschaften eines neuen fibroblasten-ähnlichen Dauer-Zellstammes EML aus embryonalen Mäuselungen. Inauguraldissertation Frankfurt/M 1962
48. Simms, H.S. und Stillman, N.P.: The stimulating action of trypsin on fresh adult tissue.  
J. Gen. Physiol. 20, 603, 1937
49. Slonim, D., Cinnerová, O., Drěvo, M., Michl, J. und Marěš, J.: Some experiments with the preparation of inactivated poliomyelitis vaccine in Czechoslovakia. III Tissue culture.  
Acta Virol. 5, 117, 1961
50. Syverton, J.T. und Mc Earen: Derivation of cell strains from esophagus, palate, liver, and lung.  
Cancer Res. 17, 923, 1957
51. Scherer, W.F., Syverton, J.T. und Gey, G.O.: Studies on the propagation in vitro of poliovirus. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (HeLa), derived from an epidermoid.  
J. Exp. Med. 97, 695, 1953
52. Staatsanzeiger für das Land Hessen: Vorläufige Vorschriften für die staatliche Prüfung von oral anzuwendenden Impfstoffen gegen Kinderlähmung aus vermehrungsfähigem abgeschwächten Virus.  
14, § 10, 1962

53. Takemoto, K.K. und Lerner, A.M.: Human amnion cell cultures, susceptibility to viruses and use in primary virus isolations.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 94, 179, 1957
54. Weinstein, H.J., Alexander, C., Yoshihara, G.M. und Kirby, W.M.: Preparation of human amnion tissue cultures.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 92, 535, 1956
55. Weiss, L.: The effects of trypsin on the size, viability and dry mass of Sarcoma 37 cells.  
Exp.Cell Res. 14, 80, 1958
56. Weiss, L.: Studies on cellular adhesion in tissue culture.  
Exp.Cell Res. 17, 499, 1959
57. Weiss, P. und Andres: Experiments on the fate of embryonic cells (chick) disseminated by the vascular route.  
J.Exptl.Zool. 121, 449, 1952
58. Westwood, J.C. und Titmuss, D.H.: Transformation in tissue culture cell lines: The possible genetic mechanism.  
Brit.J.Exp.Path. 38, 587, 1957
59. Westwood, J.C., Macpherson, J.A. und Titmuss, D.H.: Transformation of normal cells in tissue culture: Its significance relative to malignancy and virus vaccine production.  
Brit.J.Exp.Path. 38, 138, 1957
60. Willstätter, R.: Untersuchungen über Enzyme  
Berlin 1928
61. Wright, B.S. und Sagik, B.S.: Plaque formation in monolayers of chick embryo kidney cells.  
Virology 5, 573, 1958
62. Youngner, J.S.: Monolayer tissue cultures. I Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells.  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 85, 202, 1954

63. Youngner, J.S.: Monolayer tissue cultures. II Poliovirus assay in roller tube cultures of trypsin-dispersed monkey kidney.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 527, 1954
64. Zitcer, E.M., Fogh, J. und Dunnebacke, T.H.: Human amnion cells for large-scale production of polio-virus.  
Science 122, 30, 1955
65. Zitcer, E.M. und Dunnebacke, T.H.: Transformation of cells from the normal human amnion into established strains.  
Cancer Research 17, 1047, 1957
66. Zwilling, E.: Dissociation of chick embryo cells by means of a chelating compound.  
Science 120, 219, 1954

Herrn Privatdozent Dr.med. Gerhard May bin ich für das von ihm gestellte Thema, für alle Anregungen und für die laufende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Ebenso danke ich den Assistentinnen des Polio-Labors, Fräulein Henseleit, Fräulein Kauk, Fräulein Dräger und Frau Müller-Burzlaff, herzlich für ihre freundliche Hilfe bei der Einarbeitung in die Technik der Gewebekultur, der Mikrophotographie, der Serologie und für die Infektion der Kulturen.

## Lebenslauf

Ich, Ingeborg Debes, wurde am 18.10.1935 als Tochter des Gewerbelehrers Fritz Debes und seiner Ehefrau Frieda, geb. Krüger, in Korbach, Kreis Waldeck, geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Arolsen und in Goddelsheim, anschließend die Alte Landesschule ( Realgymnasium ) in Korbach von 1947 bis 1950 und die Christian-Rauch-Schule ( Realgymnasium ) in Arolsen von 1950 bis 1956. In Arolsen legte ich 1956 die Reifeprüfung ab.

Vom Sommersemester 1956 an studierte ich in Marburg, zunächst ein Semester in der Philosophischen Fakultät, dann zwei Semester Medizin. Vom Wintersemester 1957/58 bis zum Wintersemester 1961/62 studierte ich in Frankfurt Medizin und legte hier im August 1962 die ärztliche Prüfung ab.

Vom 15.9.1962 bis 30.6.1963 war ich am Hygiene-Institut in Frankfurt als wissenschaftliche Hilfskraft beschäftigt. Anschließend war ich zunächst an der II. Medizinischen Universitätsklinik München als Medizinalassistentin tätig, dann am Stadtkrankenhaus Arolsen auf der chirurgischen und auf der internen Abteilung. Am 1.2.1965 werde ich am St.-Nikolai-Krankenhaus in Höxter mit der geburtshilflich-gynäkologischen Medizinalassistentenzeit beginnen.

Arolsen, den 15.1.1965

Ingeborg Debes

Meine akademischen Lehrer waren

Professor Niessing, Marburg, Anatomie  
Professor Bücher, Marburg, Physiologische Chemie  
Professor Starck, Frankfurt, Anatomie  
Professor Wezler, Frankfurt, Physiologie  
Professor Hoff, Frankfurt, Innere Medizin  
Professor Schrade, Frankfurt, Innere Medizin  
Professor Altmann, Frankfurt, Innere Medizin  
Professor Kadenbach, Frankfurt, Innere Medizin  
Professor Kanlau, Frankfurt, Pathologie  
Professor Herzberg, Frankfurt, Hygiene  
Professor Holtz, Frankfurt, Pharmakologie  
Professor Geißendörfer, Frankfurt, Chirurgie  
Professor Ungeneuer, Frankfurt, Chirurgie  
Professor Strnad, Frankfurt, Radiologie

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Untersuchungen über die optimalen Bedingungen bei der Herstellung von Amnionprimärkulturen im Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt

unter Leitung von Herrn Priv.Doiz.Dr.med.G.May ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Arolsen, den 15.1.1965

Ingeborg Selzer







